DISS. B 1140

ANTIFUNGÁLIS HATÁSVIZSGÁLATOK A DEMETOXITYLOPHORINNAL ÉS SZÁRMAZÉKAIVAL

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Készitette és a József Attila Tudományegyetem
Természettudományi Karához benyujtja

FEHÉR LÁSZLÓ

Készült a József Attila Tudományegyetem
Mikrobiológiai Tanszékén

1974

T A R T A L O M J E G Y Z É K

1. B E V E Z E T É S. 1
2. I R O D A L M I Á T T E K I N T É S. 4
2. 1. Az alkaloidokról általában 4
2. 2. Az alkaloidok lokalizációja 5
2.3. Az alkaloidok képződése és hatása a növényben 11
2. 4. Az Asclepiadaceae család fontosabb alkaloidjai 16
2. 5. Tylophorin és cryptopleurin bioszintézise. . 2o
2. 6. Tylophorin és cryptopleurin tipusu alkaloidok hatása mikroorganizmusokra és magasabb rendü szervezetekre. 26
2. 7. Tylophorin, cryptopleurin és származékainak szerkezete, jelentősége 33
3. A N Y A G O K É S M Ó D S Z E R E K. 36
3. 1. A demetoxitylophorin lokalizációja a növényen belül 36
3. 2. A demetoxitylophorin előállitása 38
3. 3. Demetoxitylophorin bontása különböző oldószerekben, a bontott termék előállitása, és aktivitásának meghatározása 4o
3. 4. A vegyületek gátló hatásának vizsgálata. . . 44

3. 5. Hatóanyag felvétele és a sejtekből való kilépésének aránya sötétben és fényen 52
3. 6. Fenantrén származékok toxicitásának vizsgálata 54
4. E R E D M É N Y E K É S É R T É K E L É S E. .56
4. 1. Az alkaloidok lokalizációja a Cynanchum vincetoxicum szerveiben 56
4. 2. A demetoxitylophorin előállitása Cynanchum vincetoxicumból 61
4. 3. A demetoxitylophorin bontása különböző oldószerekben, a bontott termék előállitása és aktivitásának meghatározása 63
4. 4. Kémiai szerkezet és a mikrobiológiai aktivitás közti összefüggések 74
4. 5. Demetoxitylophorin felvétele és a sejtekből való kilépésének arány sötétben és fényen. . 99
4. 6. Fenantrén származékok toxicitásának vizsgálata 1o3
5. Ö S S Z E F O G L A L Á S 1o6
6. I R O D A L O M 1o9

1. B E V E Z E T É S

Nagyhatásu, szélesspektumu, antifungális antibiotikum kevés van forgalomban a gyógyászatban. A gombabetegségek elleni hatóanyagok iránt igen megnőtt az érdeklődés, mivel a bőtermő, intenziv növényfajták,beltenyésztéses hibridek, valamint az állattenyésztésben bevezetett hus, tojás,tej termelő vérvonal tenyésztéssel kialakitott egyedek általában fogékonyabbak gombakórokozóval szemben. Az ilyen növények és állatok kialakitásánál elsődleges szempont a nagy hozam, igy a külföldi fajták keresztezésével az utódok nagy részében csökken a természetes celluláris és humorális védekező rendszer a hazai kórokozókkal szemben. Számos gomba az emberi szervezetre is rendkivül toxicus. Az antifungális hatóanyagok előállitása terén az érdeklődés homlokterébe a mikroorganizmusok mellett számos alkaloida került.

Ezek közül hazánkban egyik leghatásosabbnak az Asclepiadaceae családhoz tartozó Cynanchum vincetoxicum - magyar nevén:méreggyilok - alkaloidja mutatkozott. Ferenczy, Horváth, Zsolt /1965/ közel 1500 növényt vizsgáltak meg bakterium és gombaellenes hatóanyag után kutatva. A magyar flórában négy Cynanchum fajt találtak. /Cyn.medium, Cyn.nigrum,Cyn.pannonicum, Cyn. vincetoxicum/, melyek mind széles spektrumu, nagyhatásu, antifungális hatóanyagot tartalmaztak.

Vizsgálataink célja az volt, hogy a gyógyászat - ban többezeréves multra visszatekintő Cyn.vincetoxicum hatóanyagáról mélyrehatóbb ismereteket szerezzünk, különös tekintettel a belőle izolálható alkaloida lokalizációjára, előállitására, aktivitására,fényhatására bekövetkező bomlására, toxicitására.

Munkánk során a következő kérdésekre kellett választ kapni: A növény melyik szervében és a szerv mely részében lokalizálódik a szekundér anyagcsere termékként felhalmozódó alkaloida. A kérdés megválaszolására metszeteket készitettem gyökérből, szárból, levélből és kocsányból. Fénnyel való kezelés után mikroszkoppal vizsgáltam a metszeteket. A hatóanyag már kis koncentrációban is jól látható UV fényben, igy könnyen meghatározható helye a növényi részeken belül.

A tylophorin származékok előállitására a szakirodalomban több szerző által közölt metódus található, legtöbben az oszlopkromatográfiát használták. Mi a Ferenczy és mts. által kikisérletezett, és jól bevált preparativ rétegkromatográfiás módszerrel állitottuk elő a kristályos hatóanyagot.

Kérdéses volt továbbá, hogy fény hatására milyen változás tapasztalható az alkaloida kémiai szerkezetében és mikrobiológiai aktivitásában ? A spektrum mely hullámhosszuságu sugara okozza a szerkezet megváltozását ? Ennek érdekében számos bontott terméket kellett előállitani és megvizsgálni.

Megvizsgáltuk a növényből izolált alkaloida, valamint a szintetikus származékainak mikrobiológiai aktivitása és a kémiai szerkezete közti összefüggéseket.

A JATE Szerveskémiai Intézetében Földeák S és mts által előállitott, több mint 160 származékot vizsgáltam meg, négy élesztőn, két fonalas gombán, két Grám - és két Grám - baktériumon. A demetoxitylophorinnal és származékaival végzett kisérletek eredménye egzakt választ adott arra, hogy a vegyületnek melyek az antifungális hatást eredményező részei.

Kisérleteket végeztünk annak eldöntésére is, hogy a fenantrénvázas alkaloidokat az élesztősejtek milyen arányban veszik fel ? A felvett antibiotikum hányad része lép ki a sötétben, és a fény hatásának kitett sejtekből egy óra alatt ?

Végül meg kellett győződni, hogy a Cyn.vincetoxicumból izolált alkaloida származékai - hasonlóan a növényből extrahált demetoxitylophorinhoz, vagy a Cryptocarya pleurospermából izolált cryptopleurinhoz - eredményeznek-e emlősök bőrén hólyaghuzó hatást ?

2. I R O D A L M I Á T T E K I N T É S

2.1. Az alkaloidokról általában

Az alkaloid fogalmat Meissner hallei gyógyszerész alkalmazta először 1819-ben bázikus karakterü növényi anyagok megjelölésére,melyek az emberi szervezetre általában erős, jellegzetes fiziológiai hatást fejtettek ki. Ezt a definiciót a fejlődés sok vonatkozásban tulhaladta.Ma már tudjuk, hogy alkaloidok nem csak növényekben,mikroorganizmusokban, de egyes állatfajokban is előfordulnak.

Bázicitásuk,specifikus fiziológiás hatásuk sem egyedi sajátság,mert számos más növényi anyag is rendelkezik hasonló tulajdonsággal.

A Meissner-i definiciót Hegnauer/1964/módositotta a biokémiai és kémiai szempontok figyelembe vételével.Ő az alkaloidokat három csoportra osztja:

- Valódi alkaloidokhoz sorolja az aminosavakból keletkezett N-heterociklusos vegyületeket
- Protoalkaloidoknak nevezi az aminosavakból létrejött N tartalmu vegyületeket,amelyek a nitrogént alifáslánchan tartalmazzák /efedrin,kapszaicin/
- Pszeudoalkaloidok azok a N-tartalmu természetes anyagok,amelyek nem aminosavakból keletkeznek,hanem más uton, pl terpenoidokból, poliacetátból jöttek létre.

A legtöbb alkaloida szintelen, szilárd, kristá - lyos anyag. Vannak azonban kivételek minden vonatko - zásban; pl a nikotin, pilokarpin folyékony alkaloid bázis, a berberin, szangvinarin szines származék, az ujabban felfedezett peptid alkaloidok amorfok. Izük többnyire keserü, oldékonyságuk széles határok közt változik. A szekundér és kvaterner aminok vizben jól oldódnak, a többségük azonban bázisként nem oldódik , csak szerves oldószerben. Sóik ezzel szemben jól ol - dódnak vizben, vagy alkoholban. A valódi alkaloidok többsége normál körülmények közt hig savakkal sót képez, ezért valószinü, hogy a növényekben is sóként vannak jelen. Ezen tulajdonságukat jól hasznosithatjuk kivonásuknál.

Erős bázisokkal savakkal sóikból kiszorithatók, a felszabaditott bázis kirázással a szerves oldószerbe átvihető. Optikailag aktivak, mivel bioszintézisük enzimes folyamatokhoz kötött. Többségük csapadékos reakciót ad J_2 oldattal, csersavoldattal, fémkomplexekkel, melyek kvalitativ kimutatásukra felhasználhatók. Kvantitativ vizsgálatuk alapjául szolgálhat bázicitásuk és fluoreszcenciájuk stb. Novák /1973/

2.2. Alkaloidok lokalizációja

Számos kutató foglalkozott, és foglalkozik az alkaloidok képződésével, lokalizációjával, a növényen betöltött szerepükkel. Mivel már többezer alkaloidot ismerünk, az előbb felsorolt jellemzők alapján bizonyos

általános törvényszerüségek mondhatók ki.

Molle /1906/ megállapitotta, hogy a diferenciálatlan sejtek mindig tartalmaznak alkaloidát, de nem egyenletes eloszlásban. A hajtás ősmerisztémáját követő néhány sejtsor precipitációs aktivitása nagyon gyenge , mig az elsődleges merisztéma többi része jelentős intenzitást mutat. Amint azonban a sejtek diferenciálódása végbemegy, három koncentrikus rétegben történik az alkaloidok lokalizációja. Igy az epidermiszbe,hypodermiszbe és a bélparenchimának a xylemmel határos oldalán.

A fiatal Belladonna gyökerekben az alkaloid megoszlása hasonlit az előbb mondottakhoz. A gyökérsüveg és az ősmerisztéma mögötti sejtekben nincs, de az azt követő rétegben jelentős mennyiségü alkaloidot lehet kimutatni.

Felfelé haladva erősen csökken a központi szövetekből és inkább a gyökérszőrökbe, külső cortexbe és a bélsugár parenchimában mutatható ki nagyobb mennyiségben.Idős gyökérben az edényparenchimából, az osztódó fellogénből és a fiatal parából sikerült kimutatni.

A cálix és corolla mindig bőségesen tartalmaz alkaloidát, ugyanigy az andróceum epidermiszében és a tapétumban, valamint a gynőceum minden részében jelentős mennyiségü alkaloidát találtak. Az embrióban és az endospermiumban is számottevő az alkaloida mennyisége , sőt az érett termésnek mind a három rétegéből sikerült kimutatni.

Errera /19o6/ az alkaloida megoszlásának a növényen belül öt fontosabb helyét tartja lehetségesnek:

- aktiv szövetekben
- epidermiszben és hypodermiszben
- az edénynyalábokban és az azok közvetlen közelében levő sejtekben
- tejcsövekben
- elhalt sejtekben

Aktiv szöveteken az elsődleges és másodlagos osztódó szövetet érti. Azokban a sejtekben, melyekben gyors sejtosztódás aktiv szekréció és anyagcsere folyik,nagymennyiségü alkaloidot lehet kimutatni. Colchium autumnale gyökerében és a burgonya sztoloinak oldalgyökér képző periciklusában nagymértékü az alkaloid tartalom, állapitja meg Molle/19o6/, von Morgenstein/19o6/,Errera /19o6/, Fischer/1929/, Conner/1937/, de a sebkambium is hasonló alkaloid tartalmat mutat. Molle /19o6/ a Clivia miniata leveleit levágta, és azt tapasztalta, hogy a sebkambium alkaloidot termelt, pedig a könnyező sej - tek alkaloidot nem tartalmaztak. Egy idő mulva azon - ban a kambiumból kiürült az alkaloida az őt körülvevő állandósult, de még élő sejtekbe. Jaquemin /19o6/, de Wevre /19o6/, Chaze /1932 megállapitotta, hogy a fascikuláris kambium kevésbé aktiv az alkaloida termelésben. Jelentős megfigyelés, hogy a kambium és annak szöveti kezdeményeinek enzimatikus készlete különbözik a primér merisztémák enzim készletétől. Granick /1937/,

Lotsy /1897/ kimutatta továbbá, hogy a floen és xilen iniciálisokban gyorsan és nagy mennyiségü alkaloida szintetizálódik, mely a nyalábokban levő parenchimában raktározódik el.

A bőrszövetrendszert képező sejtek alkaloid tartalma igen különböző. A gyökérszőrök aránylag sok alkaloidot tartalmaznak, de elhalásuk előtt a sejtekből eltávozik az alkaloida. A stoma sejtekben pedig éppen a fiatal korukban nem tudtak alkaloidát kimutatni Errera /1887/. Az alkaloidát tartalmazó növényben a hatóanyag kiterjed az epidermisz alatt elhelyezkedő pár sejtsorra is Molle /19o6/, Lotsy /1898/.

Az eddigi kisérletek azt mutatják, hogy a háncs rostacsöve nem tartalmaz soha alkaloidát, de a háncs többi elemeiből és a fanyalábot alkotó elemekben gondos kisérlettel sikerült kimutatni az alkaloida jelenlétét.

A tejcsövek, melyek behálózzák az egész növényt, minden részük bőségesen tartalmaznak alkaloidot Clautriau 19o6/.

Az esetek nagy többségében csak az élő szövetekben találtak alkaloidot,Tschirch /19oo/ a megtermékenyités után az embrióban és az endospermiumot körülvevő perispermiumban nagy mennyiségü alkaloidot mutatott ki. Cromvell /1933/ 0,33 % berberint talált a fiatal ágak farészében és 1,53 %-ot az öregebb, a földhöz közelebb eső növényi részekben. Az érett szárban a falak erősen

impregnálódtak alkaloiddal. Drog kinyerésére ezek a részek hasznosithatók legjobban. Élő sejtekben mindig a vacuolumokban található és a sejt elhalása után lépnek át a falba, de Wildeman /1906/, de Drog /1906/, Chaze/1932/,

Többen vizsgálták a növények alkaloid tartalmának változását a vegetációs szakaszban Schloesing /1883/, Steward /1935/, Hougland/1944/, Smirnov /1928/, Deleano /1937/, érdekes megfigyelést tettek a protein tartalom és azn alkaloid mennyiségének változása közt. Vladescu /1937/ azt találta - loo napon keresztül meghatározva az előbb emlitett két komponenst - hogy ezek mennyiségei az idő függvényében ábrázolva közel azonos lefutásu görbét adnak, és mindkettőnek a csúcsa a növény virágzásának idejére esik. Más szerzők is Mothes /1928/, Sabalitschka /1925/ hasonló megállapitásra jutottak.

Gyakran előfordul, hogy a növényen belül nem a szintézis helye tartalmazza a legtöbb alkaloidot. Ezekben az esetekben a szintézis helyéről a kész alkaloidok aktiv transzporttal más szervekbe, szövetekbe szállitódnak, és ott raktározódnak. Mothes /1928/ a Sachs által kidolgozott fél-levél módszerrel próbált az alkaloidok transzlokációjára feleletet kapni. Egyértelmü választ nem kapott, mert nem vette figyelembe, hogy a képződés helye nincs egyértelmüen meghatározva. Már 1889-ben Clautriau, Molle előtt is vizsgálta az alkaloidok képződésének és raktározódásának helyét. Ujabban Akačič /1951/, Zajceva /1959/, Pfeifer /1962/, Vágujfalvi /1961/

Lőrinczné/1961/ vizsgálták. Egyértelműen bebizonyították, hogy az alkaloidok már a csirázás megindulásakor megjelennek, amikor a magvak legtöbbje még csak duzzadt. Azóta már mások is kimutattak mákcsira növényekben alkaloidokat. Massicot /1961/, Pfeifer és Heydenreich/1961/, Neubauer /1964/, Sárkány és mtsai /1963/ szövettani vizsgálatai alapján tudjuk, hogy a máknál a tejedény - rendszer már a néhány napos csiragyökérben jól felismerhető,és ezen edényekben az alkaloida kimutatható. Felmerült az a kérdés, hogy a tejedények és az alkaloidok szoros kapcsolatba vannak-e egymással ? Vagyis valóban ugy van-e, ahogy azt Fairbain /196o/ állitja, miszerint az alkaloidok kizárólag a tejedényekben vannak, a tejedény rendszerrel rendelkező növényeknél. A feltevést cáfolja Sárkány 1966-1967-ben végzett kisérletei, amenynyiben nyugvó mákmag endospermiumában és embriójában, gyökér és hajtás tenyészókupjának osztódó szöveteiben alkaloidokat sikerült kimutatni, tejedényeket viszont nem talált.

Erre az eredményre jutott Vágujfalvi /197o/ is, aki közvetett eljárást dolgozott ki e kérdés megválaszolására. Megállapitotta, hogy a tejedény rendszerben is, és ezenkivül a többi szövetben is felhalmozódnak alkaloidok. Az akkumuláció a két helyen eltérő törvényszerüségek szerint megy végbe. Szerinte:"a tejedény rendszernek az alkaloidok szállitásában való részvétele az alkaloidos fajokban kevéssé valószinü."

Általános vélemény, hogy az öregedő levelek alkaloid tartalma csökken. A hiány oka lehet, hogy az alkaloidok a szárban evakuálnak, de lehet, hogy in situ elbomlanak.

2.3. Az alkaloidok képződése és hatása a növényekben

Képződésük igazi okát jelenleg még nem sikerült egyértelműen megállapitani. Legelfogadottabb nézet az, hogy az alkaloidokat a metabolizmus melléktermékeinek fogjuk fel, ami azt is jelenti, hogy a képződésnek nincsenek további következményei a növényre. Ezt a feltevést erősiti az a tény, hogy a növényvilág közel 9o %-a nem tartalmaz alkaloidot. Sőt, azok a gyógynövények sem mutatnak semmiféle abnormalitást habitusukban, melyek alkaloida mentes sarjakat hoznak létre Jones/1967/.

Elgondolkoztató az a tény, hogy az alkaloidok legnagyobb része az-állati szervezetbe vive- a magasan organizált idegszövetre fejti ki hatását, aminek jelenleg nincs megfelelője a növényvilágban. Analógia keresés talán indokolatlan lenne, de más fajta jelzések jelenléte egyértelműen még sem pro, sem kontra nincsenek bizonyitva.

A növényben kifejtett hatásukról az évszázadok során számos elképzelés született. Az első, legvalószinűbbnek látszó javaslat Errerától származik, aki azt vetette fel, hogy az alkaloidok a növényevő állatok el-

leni védekezésül szolgálnak, indokolva e kijelentését azzal a megfigyeléssel, hogy az alkaloidok a perifériás szövetekben arányleg nagy koncentrációban vannak jelen. Ez a felfogás azonban minden kritikát nem áll ki, mert a dohány levélen élő egyes hernyófajok a dohánylevelet fogyasztják a nélkül, hogy ez rájuk káros lenne. Viszont a vadburgonya demissin nevü alkaloidja védelmet biztosit a növénynek a burgonyabogár kártételével szemben. Szalai/1968/, Czopek/1925/, Winterstein/1931/ Juckermack/1910/ állitják, hogy az alkaloidák nem alkalmasak arra, hogy a növényi és állati paraziták támadását megakadályozzák cidikus, vagy statikus hatást fejtsenek ki. Ezzel szemben a Solanaceae család alkaloidjairól Kevei/1969/, Berek /1971/ kimutatták, hogy hatásosak baktériumokkal és gombákkal szemben.

Pictet/1914/ az alkaloidok szerepének uj lehetőségét villantja fel, mondván, hogy az aminosavak közül a prolin, hisztidin, triptofán akkumulációja alkaloid formában történne sejten belül. Mivel az alkaloidok nem mérgezőek azon növény számára, mely szintetizálja, fel lehet tételezni, hogy képződésül olyan anyagokat használnak fel, melyek akkumulációja másképpen okozna kárt a sejt anyagcseréjében.

Mivel merisztéma sejtekben képződnek, igy vagy a vakuolumban, vagy a sejtek falában halmozódnak fel, ebből azt a következtetést vontam le, hogy a sejtek felépitéséhez szükséges, és a feladatukat betöltött en-

zimek bomlásából származó aminósavak egy részéből keletkeznek, melyek aktivitásuk révén kárt okoznának a cytoplazmában.

A következő verzió szerint a növények anyagcsere regulációjában vennének részt. James/1967/ megállapította, hogy a co-enzimek és a prosztétikus csoportok nagy részé heterociklusos gyűrűt tartalmaz, ezért lehetséges, hogy ilyen, vagy ehhez hasonló szerepük van az anyagcserében. Működhetnek azonban inhibitorként, vagy aktivizátorként is.

Ezeknél a hipotéziseknél nem szabad megfeledkeznünk arról a tényről, hogy a növények 9o %-ából eddig semmilyen alkaloidot nem sikerült kimutatni, ezért nem lehet univerzális szerepük a növényben.

Az is elképzelhető, hogy olyan funkciót töltenek be az alkaloidot termelő növények sejtjeiben, melyet más növényeknél számos vegyület összehangolt reakciója képes csak elvégezni.

Melléktermék szerepük ellen szól az a megfigyelés, hogy komplex szintétikus mechanizmusok hozzák létre.

James igy fogalmazza meg a növényen belül betöltött szerepüket: "Ha összegyüjtjük a növényi anyagok szintézisének végeláthatatlan sorát,/poliszacharidok, fehérjék, glükozidok, stb/ nehéz elhinni, hogy ezek a variánsok mindegyikének képződése csak egy specifikus szükséglet elvégzésére keletkezett. Valószinübbnek látszik, hogy a lehetőségek gazdagságának vagyunk tanúi.

Az alkaloidok a növényeknél ugy melléktermékek talán , mint az állatoknál a karbamid. "

Mai ismereteink szerint a növényekben sem alapvető vázépitő, sem energetikai szempontból fontos anyagként nem szerepelnek. Fairbairn és mtsai megfigyelték,hogy a mákmagban az alkaloidok csirázás megindulásakor gyorsan lebomlanak, aminosavszerü vizoldékony anyaggá. Ez azt jelenti, hogy alkaloidokat tartalmazó növényekben aminosav poolként szerepelnének. Mothes/1969/ megállapitása szerint ez a folyamat az állatvilágban meglevő nyilt exkréciónak megfelelő belső folyamat a növényvilágban.

Eredetükről is annyit tudunk, mint a növényben betöltött szerepükről. Keletkezésükkel a századforduló óta foglalkoznak behatóbban. Ebben a munkában Pictet, Winterstein, Trier, Schöpf, Robinson és még számos kutató kiemelkedőt alkotott. Az alkaloidok szerkezetének tanulmányozása alapján arra a következtetésre jutottak, hogy az alkaloidok aminosavakból épülnek fel. Ezt a feltevést az izotopokkal végzett beépülési kisérletek végérvényesen igazolták.

Az eddig megvizsgált többezer alkaloidról megállapitották,hogy néhány proteinogén aminosavból, vagy ezeknek dekarboxileződött, vagy oxidativ dezaminálódással aldehiddé alakult származékából szintetizálódnak. A kiindulási termékként szolgáló aminósavak szerint a következő biogenetikai csoportba soroljék az alkaloi -

dákat:

- lizin csoport; piridin,piperidin,kinolizidin vázas alkaloidok
- ornitin csoport; pirrolidin,tropán vázas alkaloidok
- fenilalinin csoport; izokinolin származékok
- triptofán csoport; indolvázas alkaloidok
- hisztidin csoport; amidazolok

Természetesen az aminosavakon és aminosavszármazékokon kivül más primér és szekundér anyagcsere termékek is beépülnek a bioszintézis során, igy pl acetát, mevalonát, sikimát, stb Novák/1973/.

Kisérleti megfigyelések szerint egyes alkaloidok váza protoalkaloidokból keletkeznek, melyek nem enzimatikus uton jönnének létre a sejt citoplazmájában, hanem Mannich kondenzációval az előbb felsorolt származékokból Szalai/1968/.

Ha ezt a kijelentést elfogadjuk, ugy könnyen megérthetjük azt a tapasztalati tényt, hogy egy növényben számos szerkezetileg rokon alkaloidok sora található. A mennyiségileg tulsulyban lévő alkaloidot főalkaloidnak, a többit mellékalkaloidnak nevezzük. Nemcsak a fajon belül, hanem génusra, familiára, sőt ordóra is érvényesek, hogy biogenetikailag rokon alkaloid csoportok találhatók a rokon taxonokban. Igy általában az Apocynaceae családban indoalkaloidok, a Papaveraceae családban izokinolinok, az Asclepiadaceae családban

tylophorin és krptopleurin származékok találhatók arányalag jelentős mennyiségben. Érdekes azonban,hogy a familia nem minden tagja tartalmaz alkaloidot.

Ebben a dolgozatban az Asclepiadaceae család alkaloidjaival, ezen belül a Cyn.vincetoxicumban található alkaloidok lokalizációjával, előállitásával, és származékainak vizsgálatával foglalkozunk részletesebben.

2.4. Az Asclepiadaceae család fontosabb alkaloidjai

Az Asclepiadaceae családba tartozó növények alkaloidjai iránt megnőtt az érdeklődés. Számos kutató kezd foglalkozni a családhoz tartozó fajok alkaloidjaival , egymástól függetlenül. Gellert/1962/, Govindacari/1954/, Háznagy/1965/, Ferenczy/1965/, Rao/197o/, Pailler/1965/ az Asclepiadaceae familia növényeiből izolált fontosabb alkaloidokat a következő táblázatban ismertetem/lásd:17-19 oldal/

A táblázat végén felsoroltam a dolgozatban szereplő az Asclepiadaceae családból izolált tylophorinokhoz szerkezetileg nagyonk hasonló a Lauraceae család növényeiből izolált cryptopleurinok előfordulását is. A felsorolás nem teljes,csak azok a növények és alkaloidok szerepelnek, amiket a nálunk megjelenő szakirodalomból ismerek. A táblázatból jól látható, hogy rendszertanilag

1. táblázat. Asclepiadaceae és Laureaceae család fontosabb alkaloidjai

Család	Genus, faj	Alkaloida neve	Tapasztalati képlete	Izolálta
Asclepiadaceae	Tylophora asmatica	tylophorin	$C_{24}H_{27}NO_4$	Hooper /1891/ Ratnagiriswaran /1935/
"	"	tylophorinin	$C_{23}H_{27}NO_4$	Ratnagiriswaran /1935/ Govindachari /1961/
"	Tylophora crebriflóra	tylocrebrin	$C_{24}H_{27}NO_4$	Gellért /1962/
"	Tylophora indica	demetoxitylophorin	$C_{23}H_{25}NO_3$	Rao /1972/
"	Tylophora dalzelii	demetoxitylophorinin	$C_{23}H_{25}NO_4$	Rao /1970/
"	Tylophora crabriflora	A-tól E-ig		Rao /1970/
"	Cynanchum vincetoxicum	tylophorin	$C_{24}H_{27}NO_4$	Pailer /1965/
"	" "	vincetoxikum bázis A	$C_{23}H_{25}NO_3$	Pailer /1965/
"	" "	demetoxitylophorin	$C_{23}H_{25}NO_3$	Háznagy, Ferenczy /1965/
"	" "	tylophorinin	$C_{23}H_{25}NO_4$	Wiegrebe /1972/
"	" "	6-OH-demetoxitylophorin	$C_{22}H_{24}NO_3$	Wiegrebe /1960/
"	" "	demetoxitylophorin	$C_{23}H_{25}NO_3$	Wiegrebe /1971/
"	Cyn. medium	"	"	Horváth, Zsolt, Ferenczy /1965/
"	Cynanchum nigrum	"	"	" " "
"	Cynanchum pannónicum	"	"	" " "

Család	Genus, faj	Alkaloida neve	Tapasztalati képlete	Izolálta
Asclepiadaceae	Antitoxicum funebre	antofin	$C_{23}H_{25}NO_3$	Platanova /1958/ Henry /1949/
"	Closrostigma sp.	clorostigmin		Wehner /1950/
"	Sarcolobus sp.	coniine	$C_8H_{17}N$	Klein /1931/
"	Cryptolepis sanquinolenta	criptolepin	$C_{16}H_{12}N_2$	Cliquart /1924/
"	Cryptolepis trianguláris	criptolepin	$C_{16}H_{12}N_2$	Cellert /1962/
"	Calotropis sp.	uscharin	$C_{17}H_{25}NO_4S$	Hesse /1959/
"	"	voruscharin	$C_{31}H_{43}NO_8S$	Hesse /1960/
"	Asclepias syriaca	nikotin	$C_{10}H_{14}N_2$	Marion /1939/
"	Morrenia brachystephana	morrenin		Trier /1931/
Lauranceae	Cryptocarya pleurosperma	cryptopleurin	$C_{24}H_{27}NO_3$	de la Lande /1943/
"	" "	szekocryptopleurin	$C_{24}H_{29}NO_3$	
"	Crypt. bovlei	cryptopleurin	$C_{24}H_{27}NO_3$	Ewing /1953/
"	Crypt. triplinervie	"	"	Cook, Hayner /1954/
"	Crypt. pleurosperma	cryptopleuridin		Johns, Lamberton /197o/
"	" "	crytopleurospermin		" "

Család	Genus, faj	Alkaloida neve	Tapasztalati képlete	Izolálta
Lauryceae	Crypt. konisii	crykonisin	$C_{18}H_{17}NO_3$	Johns, Lamberton /1970/
Urticaceae	Boehmeria platyiphylla	cryptopleurin	$C_{24}H_{27}NO_3$	Hart, Lamberton /1968/
"	Boeh. cylindrica	cryptopleurin	"	Krompotice /1972/
"	Boeh. platiphylla	pleurospermin	$C_{14}H_{14}NO_3$	
"	Boeh. platiphylla	throkinolizidin		Hart, Johns /1968/
Moraceae	Fisus septica	septicin	$C_{24}H_{29}NO_4$	Russel /1963/
"	"	antofin	$C_{23}H_{25}NO_3$	Herbert, Moody /1972/

különböző családok egyedei /Asclepiadaceae,Lauraceae,stb/ szerkezetileg közel azonos alkaloidokat szintetizálnak.

A felsorolt alkaloidok szerkezeti képleteit összehasonlitva arra a következtetésre jutottam, hogy szintézisük azonos kiindulási termékekből, közel azonos módon játszódik le.

2.5. Tylophorin és cryptopleurin bioszintézise

Az alkaloidok bioszintézisével először Robinson és Schöpf foglalkoztak.Megfelelő fiziológiai körülményeket biztositva, néhány egyszerübb szerkezetü alkaloida szintézisének záró lépését meghatározták végre. A vegyületek bioszintézisének mechanizmusát sokkal jobban nyomon követhetjük a rádioaktiv szén, nitrogén beépitésével.

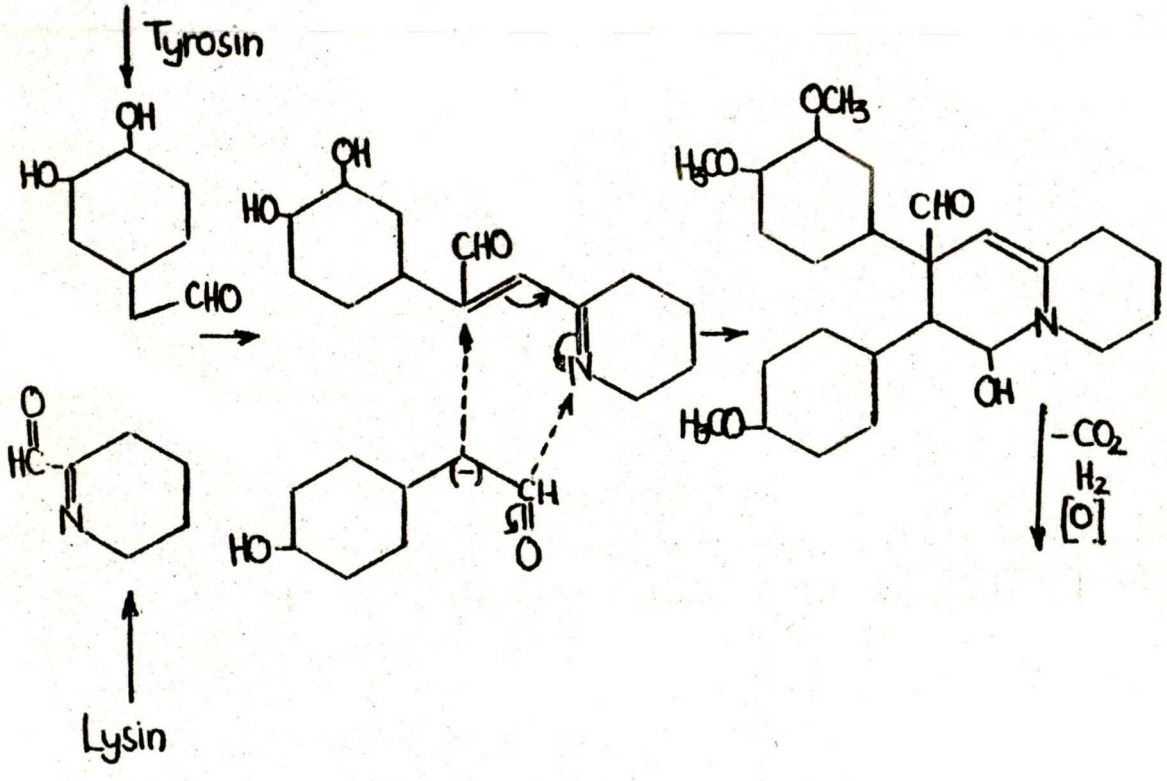
Egyértelmü, megnyugtató választ azonban még ezek a kisérletek sem adnak. Még igy is hipotétikus marad a szintézis lépéseinek pontos sorrendje a növényen belül. Jelzett atomok bevitelével Mothes megállapitotta, hogy idős és fiatal Datura növények nem egyforma intenzitással termelik az alkaloidot,vagyis az alkaloid szintézis életkorhoz és egy meghatározott strukturához kötött enzimtevékenység eredménye, Szalai/1968/.

Mothes 25 alkaloida tipust különböztet meg a kémiai szerkezetük alapján. Novák, Háznagy az alkaloidok bioszintézisében szerepet játszó proteinogén aminosavak alapján öt biogenetikai csoportot sorol fel, melyeket az előző fejezetben ismertettem. A tylophorin és cryptopleurin származékok a fenilalanin/tirozin/ csoportba tartoznak.

Bioszintézisükkel nagyon sokan foglalkoznak, főleg azóta, hogy fehérjeszintézist gátló tulajdonságuk közismertté vált.

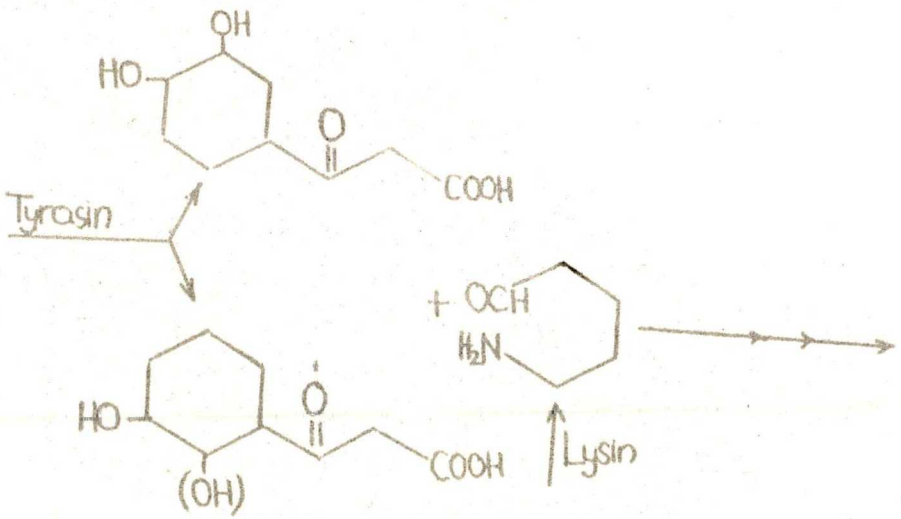
Néhány hipotézist ismertetnék bioszintézisükkel kapcsolatban:

A cryptopleurin bioszintézisére Marachini és Beleau a következő utat tételezik fel:



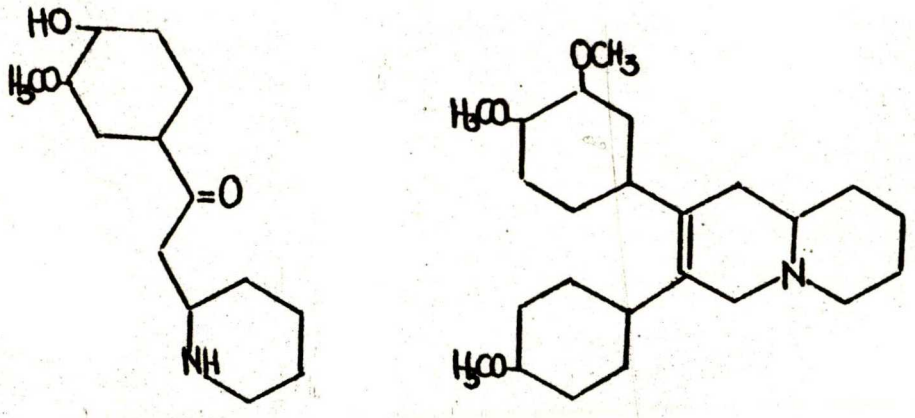
1.ábra Marachini és Beleau hipotézise a cryptopleurin bioszintézisére

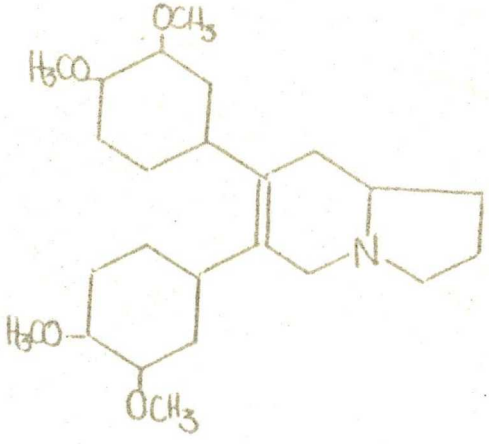
Hasonló uton képzeli el az alkaloidok bioszintézisét Govindachari is, azzal a különbséggel, hogy más kiindulási termékkel számol.



2.ábra Govindachari elképzelése a crypto-pleurin bioszintéziséről

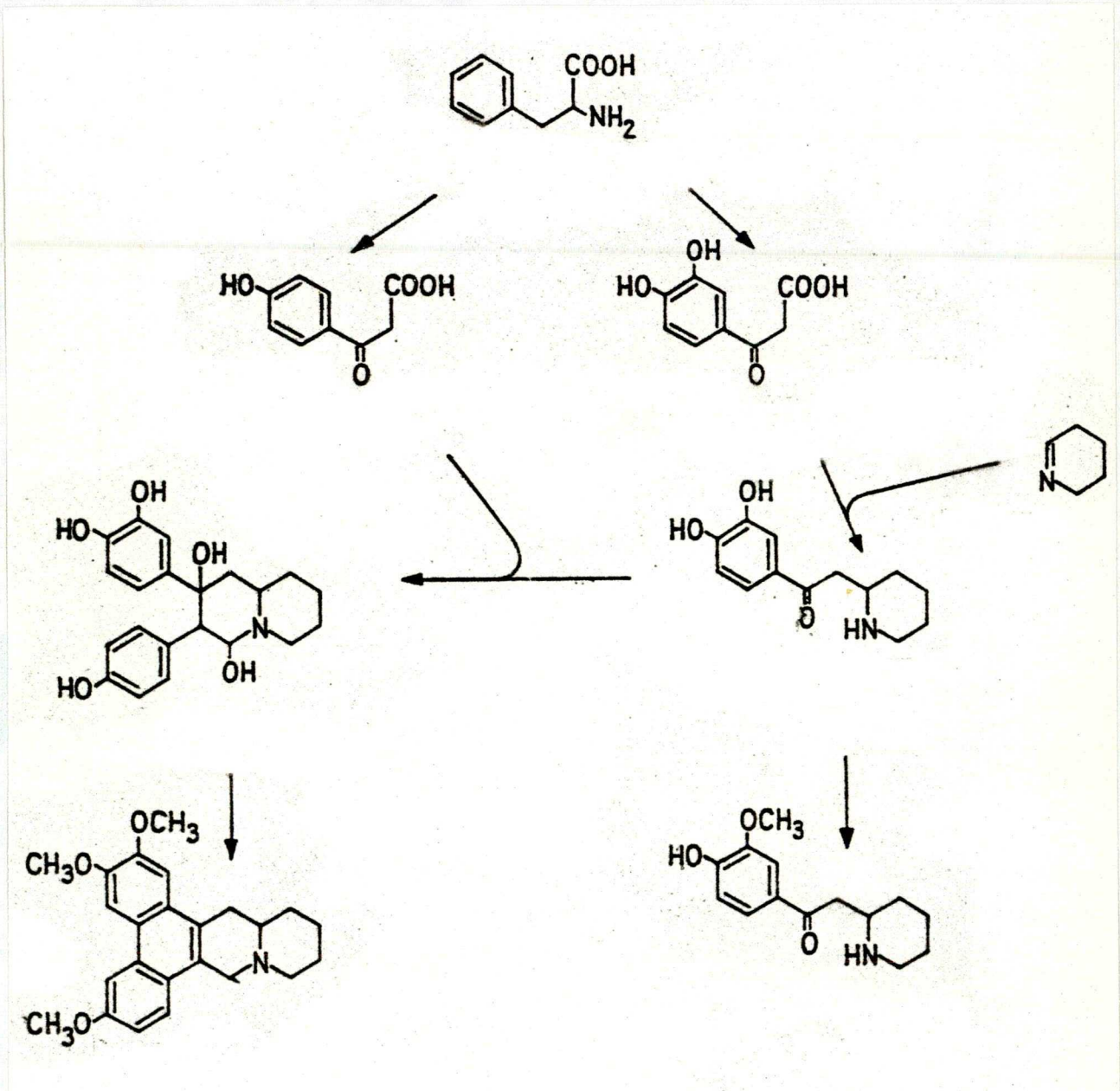
A bioszintézisek feltételezett utjának helyességét bizonyitja, hogy néhány éve ezeket a "közti-termékeket" sikerült izolálni. Cryptocarya pleurospermából, és a Boehmeria platiphyllából izolálták a pleurospermint és a secocryptopleurint. Ugyancsak sikerült ilyen közti-terméket kapni a Moraceae család egyedeiből is. Ficus septicaból Russel a septicinnek nevezett alkaloidát különitette el, mely secotylophorinnak felel meg.





3. ábra. Tylophorin és cryptopleurin bioszintézisének közti-termékei

Mothes és Schütte /1969/ által elképzelt bioszintézis kiinduló vegyülete a fenilalanin, mely szerintük a következő átalakuláson megy át:

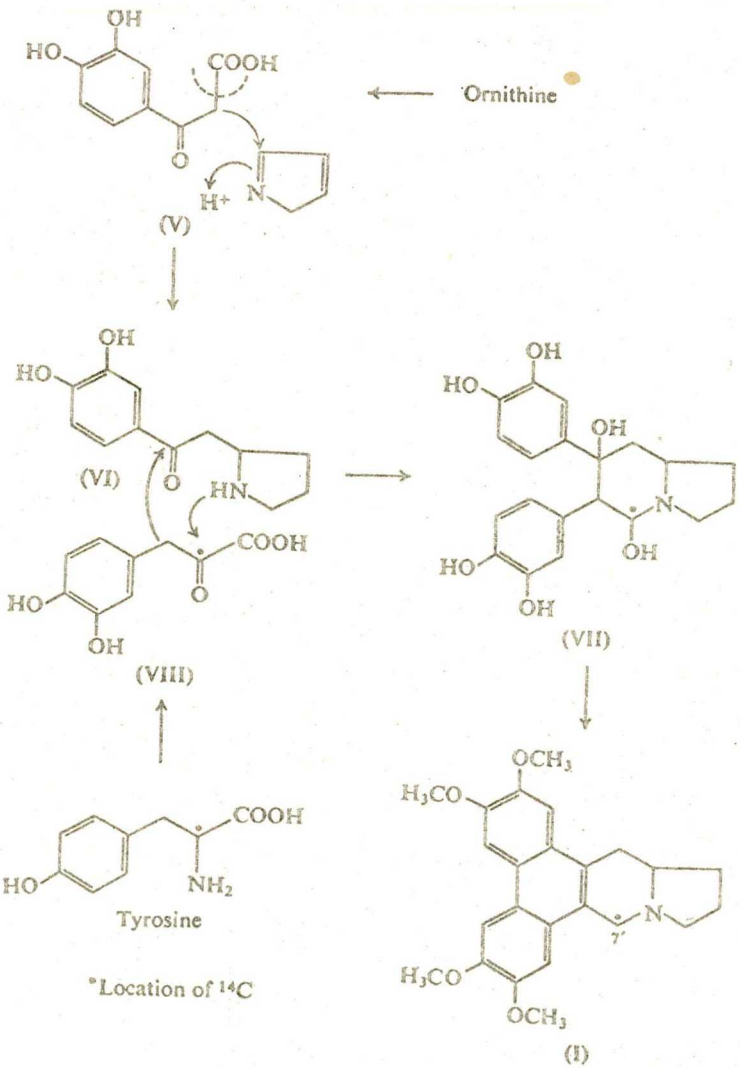


4.ábra Mothes és Schütte által elképzelt cryptopleurin bioszintézis

A pleurospermin végtermékként itt is megtalálható, és a szintézis köztitermékeinek szerkezeti képletei is

közel azonosak. Feltevésünk helyességét igazolja, hogy Hart és mts /1968/ Boeh.platiphyllából dihidroxi-fenilalanint és throkinolizidint izoláltak.

Mulchandani és mts /1969/ tirozin-2-^{14}C-vel végeztek kisérletet a tylophorin bioszintézisének pontos meghatározására. Tylophora astmaticat 14 napig kezeltek a jelzett vegyülettel. Ők a következőképpen képzelik el a tylophorin bioszintézisét:



5.ábra Mulchandani tirozin-2-^{14}C-el végzett kisérleteinek eredménye a tylophorin bioszintézisének meghatározására

A jelzett C beépülése jól nyomon követhető a szintézis folyamán.

Benjámin és Mulchandani /1937/ Tylophora indica szövetkulturáját fenilalaninnal, 2,4 D-vel és indolecetsavval kezelték. A szövetkultúrából fenantro-indolizidin alkaloidokat nem sikerült izolálni, sem a kezelés előtt, sem a kezelés után. Ferenczy és mts /1968/ Cynanchum vincetoxicum szövettenyészetéből próbáltak demetoxitylophorint extrahálni. Többszöri kisérletezés után megállapitották, hogy a szövettenyészetet alkotó sejtek alkaloidot nem tartalmaznak.

Ezek a kisérletek egyértelmüen bizonyitják, hogy az organizmuson belül egy meghatározott struktura felelős az alkaloid bioszintéziséért.

2.6. Tylophorin és cryptopleurin tipusu alkaloidok hatása mikroorganizmusokra és magasabb rendü szervezetekre

Cynanchum vincetoxicumról első irásos emlék Dioscoridestől származik i.u.46-ból. Ő többszáz növény részletes leirását adja, azok gyógyászati felhasználhatóságát kiemelve. A Cyn. vincetoxicumról a következőket irja: Hatásosan alkalmazható mérget termelő állatok marása, csipése esetén, gyógyitólag hat kólikás megbetegedések ellen, és fekélyes sebekre szórva poralakban a sebek gyógyulását

segiti elő.

A középkor gyógyitói szintén alkalmazták a nö - vényt. Egy-két jelentősebb munkát felsorolnék, hogy lássuk, évszázadokon keresztül milyen betegségek gyógyitására alkalmazták. Fouchs/1549/ Discorides kivonatának nevezi a Cynanchum gyökeréből borban kifőzött levét,melynek kiváló tulajdonságai vannak. A főzet leve enyhiti a görcsöket, és a mérges állatok marása esetén, borogatásként alkalmazva, megakadályozza, hogy a méreg a szivig hatoljon. Enyhülést ad az emlő rosszindulatu betegségeinél is.

Paulus Eginéta és Plinius/1567/ felsorolják a növény Discorides által leirt gyógyészati alkalmazásait,majd közzéteszik saját tapasztalataik eredményeit is.Leirják, hogy a főzet kiválóan alkalmas menstruáció kiváltására, valamint ebmarás ellen is. Mivel ellenáll minden méregnek, ezért nevezik a mérgek legyőzőjének,vitrixtoxinak. Mindketten megemlékeznek még a gyökérből készitett főzetnek arról a rendkivül hasznos gyógyászati hatásáról, hogy a vizkórságot és büzös fekélyes sebeket lehet gyógyitani vele.

Tabernaemontanus /1591/ német alapossággal leirja a gyökérből készült főzetnek belső és külső felhasználási lehetőségeit.

Belső használatra felsorolja az előbb emlitett szerzők által leirt betegségek elleni szerként, és mint jóhatásu gyógyszert emliti a pestis ellen is. Belső hasz-

nálatra a főzet elkészitésének módját a következőképpen irja le:" 1/2 font Asclepiast véve s azt egy éjszakán keresztül 1 pint jó borban áztatva, majd utána egyharmadára süritve, minden reggel forrón, még az ágyban kell meginni és izzadásig a takaró alatt maradni."

Külső használatra a következő receptet adja meg: A száraz gyökeret,levelet porrá őrülve a sebekre rá kell hinteni vastagon". A por jól alkalmazható a mell és a méh rosszindulatu fekélyei ellen.

Boek/1731/ belső felhasználásra az előbb felsoroltakon tulmenően leir egy receptet ájulás és "szivremegés" ellen: "Végy egy negyed lat porrátört gyökeret és egy nyolcad lat citrommagot, készits belőle főzetet, és melegen idd meg." Külső felhasználásra a sebek és fekélyek gyógyitásán kivül ebben az időben szülési fájdalmak csökkentésére is használták, mégpedig ugy, hogy a gyökérből készitett főzetbe kellett beleülni.

Lewis/1775/ francia kutató izzasztóként és vizelethajtóként ajánlja, mint kiváló gyógyszert.

Összegezve a leirtakat megállapithatjuk, hogy elsősorban daganatok, fekélyek gyógyitására használták, felismerve nagymérvü fungicid, baktericiđ hatását. Nagyon érdekes az ellenméregként való alkalmazása, melyet minden szerző megemlit több évszázadon keresztül. Több szerző emliti a vizkórság elleni és a menstruációt szabályozó szerként. A szteroid hormonok szintézisére, azok működésére kifejtett hatása tisztázatlan, érdemes lenne vele foglalkozni.

Nemcsak az ó- és középkorban használták gyógyitó

hatása miatt, Pailer/1965/ szerint a német nép közt még ma is használatos gyógynövény. Pailer a következőket irja a hegyek déli lejtőjén termő, kedvelt gyógynövény hatásáról: "Az erősen szerteágazó husos gyökerét régebben pestis ellen, most vérnyomás szabályozóként, oedémás megbetegedések ellen vizhajtó szerként, és görvélyes megbetegedéseknél használják a falusi emberek."

Lényeges változást természetesen a növénykémia megjelenése hozott, mely elsősorban a gyógynövények alkaloidjainak izolálásával, az izolált származékok szerkezetének megismerésével foglalkozott.

Az Asclepiadaceae család tagjainak alkaloidjairól az előző fejezetben leirtam, hogy kik izolálták. A kristályosan előállitott származékok fiziológiai hatásával az utóbbi években számos kutató foglalkozik. A rendkivül nagy érdeklődés annak köszönhető, hogy fehérjeszintézist gátlók lévén, a sejtszaporodást - rosszindulatu daganatokat is beleértve - erősen gátolják.

A fenantro-indolizidin vázszerkezetü alkaloidokat először Ratnagiriswaran/1935/ izolálta és Ratnagiriswaran Venkatachalam irta le először hólyaghuzó hatásukat, amit Govindachari, Pai/1961/, Gellert/1962/ szintén leirtak. Copra/1937/ tanulmányozta behatóan a tylophorin farmakologiáját. Megállapitotta, hogy 50000 x-es higitásban a Paramecium caudatumra toxikusnak mutatkozik. Békáknál a 0,4 mg/kg letális dozis, mig ugyanez a mennyiség egereknél és tengerimalacoknál halált nem idézett elő. Dolgozatában leirja továbbá, hogy szivizomra bénitólag, ugyan-

akkor a véredények simaizmára serkentőleg hat. A vér - nyomás kezdetben csökken, majd a normális nyomás fölé való emelkedése a tylophorin hatásával magyarázható.

Gellert/1964/ Rao/1966/ kisérleti eredményeiből tudjuk, hogy a tylocrebrin jelentős hatásu lymfoid leukémia ellen L 121o tipusu egér sejtekben 1omg/kg dozisban, továbbá a HeLa sejtek növekedését is gátolja.

Belkhode és mts/1967/ azt vizsgálták, hogy a tylophorin az uracil beépülését gátolja-e Ehrlich ascites-tumor sejtekbe. Megállapitották, hogy 10^{-5} M mennyiség 98 %-os beépülés mellett az uracil beépülését nem gátolta, viszont azt tapasztalták, hogy leucin incorporációját $1o^{-8}$ M gátolja.

Chitnis, Khandalekar/1927/ irta le, hogy a Tylophora indica leveléből és szárából kivont alkaloid gátló hatásu a P 388 és L 121o jelzésü rákos sejtekre.

Mou-Tuan Huang és Crollmann/1972/ a tylophorin fehérjeszintézis gátló hatását vizsgálták sikeresen HeLa sejtekben és nyul reticulocytákban.

A demetoxitylophorin hatását elsőként Ferenczy és mts /1965/ kutatták.Megvizsgálták a vegyület hatását 4o fonalas, 4o élesztő és 2o dermatophiton gombával szemben. Az alkaloida 0,015 és 1,0 µg közti mennyiségét találták hatásosnak. Berek/1971/ összehasonlító vizsgálatokat végzett több tylophorin és cryptopleurin származékkal. A demetoxitylophorin 0,15 µg/ml koncentrációban az Actinomucor repens sejtek , 0,1 µg/ml koncent-

rációban a Candida albicans sejtek növekedését teljesen gátolta.

Ferenczy /1972/ meghatározta az alkaloida hatásmechanizmusát. A vegyület fehérjeszintézis gátlást hoz létre ugy, hogy a riboszomák összekapcsolódását megakadályozza.

Ferenczy/1972/ a demetoxitylophorinnál egészen nagy higitásban /10^{-12}/ azt tapasztalta, hogy serkentőleg hat élesztő sejtekre. Ezt a kisérletet én is megismételtem , és 3-4 x-es sejtgyarapodást tapasztaltam a kontrollhoz viszonyitva.

A cryptopleurin és származékainak hatásával sokkal többen foglalkoztak. A vegyületet 1948-ban de Lande izolálta Cryptocarya pleurospermából, és ő vizsgálta meg elsőként hatását is. A vegyület emlősök bőrén hólyagot huz. Ezt a tulajdonságát később Gellert és Riggs/1954/, majd Bradsher és Berger/1958/ is leirják.

Mikroorganizmusokra kifejtett hatásáról először Bernard/1949/ tesz említést, majd 1950-ben Cleland irja, hogy élesztő sejtek és osztriga embriók élettevékenysé - gét gátolja.

Hoffman/1952/ azt tapasztalja, hogy igen kis koncentrációban elősegiti az idegsejtek regenerálódását.

A tumor sejtekkel szemben kifejtett gátló hatása ma már jól ismert. Először Littlefield és Keller/1957/ vizsgálta Ehrlich ascites-tumor sejtekből készült homogenizátumban. A tumor sejtekből készült homogenizátumban leucin beépülését megakadályozta a fehérje molekulába.

Fehérjeszintézist gátló hatásáról az elmult pár évben több cikk jelent meg, Donaldson/1968/, Belkhode/1967/, Polya/1968/, Forbes/1968/. Belkhode /1967/ ugyanakkor megállapitja, hogy az uracil beépülését 10^{-5} M-nál sem gátolja. Donaldson/1968/ E.coli sejtek fehérjeszintézisének gátlását szerette volna elérni, de a cryptopleurin 10^{-5} M-ja sem gátolta a szintézist. Hasonló eredményre jutott Elliot/1968/ , aki munkatársával fenilalanin incorporációját vizsgálta E.coli riboszomákban.

A cryptopleurin hatásáról átfogó cikket közöl Davey/197o/. A cikkben a következőket irja: az élesztő sejtek riboszomájába való aminosav beépülést 0,2-1,0 uM-nál, az élesztők mitokondriumának fehérjeszintézisét 2-1o uM-nál, az E.coli riboszomákban a fehérjeszintézist 2o-1oo uM-nál, patkány májában a fejérjeszintézist 2-1o uM-nál gátolja.

Krompotice/1972/ a herpes virus ellen találta hatásosnak, Stosk/1972/ megállapitása szerint erősen gátolja a feltételes reflexek mükődését.

Davies/1974/ cryptopleurin rezisztens élesztő törzset izolált, továbbá meghatározta számos cryptopleurin származék aktivitását egész sejtekre és sejthomogenizátumokra.

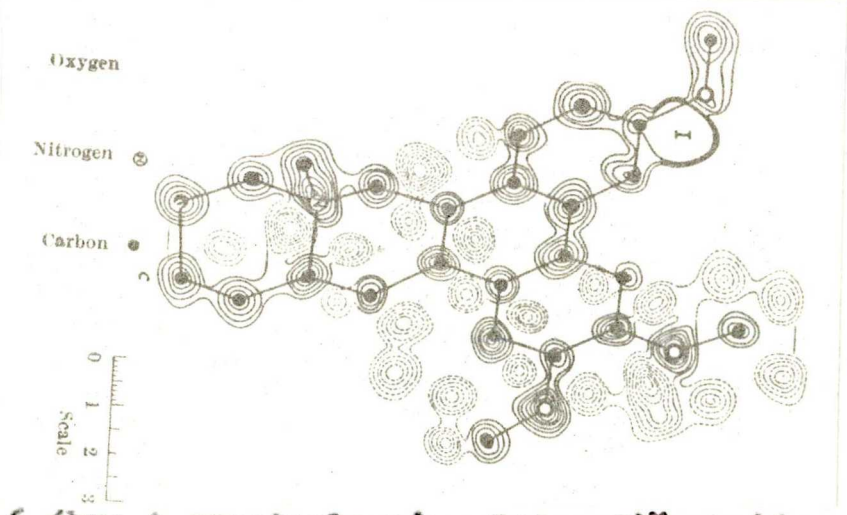
A cryptolepin hatásáról Clinquart/1929/ megállapitotta, hogy erős és hosszantartó vérnyomásesést idéz elő.

2.7. Tylophorin, cryptopleurin és származékainak szerkezete, jelentősége.

A tylophorin és tylophorinin szerkezeti képleteit 1954-ben és 1961-ben sikerült Govindacharinak tisztázni. A vegyületekben a nitrogén tercier és két gyürü közös atomja. Az IR és az UV spektrumokból, továbbá azt ismegállapitották, hogy a négy darab oxigén éterkötésben van, és mindegyik metoxi csoport tagja. Mindkét spektrum azt bizonyitotta, hogy á fenantrén váz van a molekulában. Zn poros dessztillációval megállapitották a fenantrén és indolizidin váz annelációs pontjait is, Hegyes/1972/.

A molekula elképzelt szerkezetének helyességét Govindacharinak és VisWanathannak szintézissel sikerült bizonyitaniuk.

A cryptopleurin szerkezetileg nagyon hasonlit a tylophorinhoz. Szerkezetét 1954-ben Gellert határozta meg. Az elképzelt szerkezet helyességét Fridrichson és Matthieson röntgendiffrakciós módszerrel bizonyitották.



6.ábra A cryptopleurin röntgendiffrakciós képe

A kapott fényképet összehasonlitva a Gellert féle szerkezeti képlettel, megállapitható, hogy a két vegyület teljesen azonos.

Gellert és Govindachari 1962-ben a tylophorinnal megegyező összegképletü alkaloidot izoláltak, és megállapitva szerkezeti felépitését 2, 3, 5, 6 tetrametoxi-fenantro-indolizinnek adódott, és tylocrebrinnek nevezték el.

Rao/197o/ hat uj tylocrebrin származékot izolált Tylophora astmaticából, és meghatározta a szerkezeti képletüket. A Tylophora crebriflora is rendkivül gazdag tylophorin tipusu alkaloidokban.

A Cynanchum vincetoxicumból Háznagy és mts/1967/ izolálnak egy alkaloidot, és kisérletet tesznek szerkezeti képletének meghatározására, mely demetoxitylophorinnak adódik. Ugyanezt a vegyületet Wiegrebe és mts 1969-ben izolálják és meghatározzák szerkezeti képletét.

A tylophorin és cryptopleurin származékok szintéziséhez Földeák és Hegyes az általuk módositott Marschini és Beleau eljárást alkalmazták.

A származékok előállitása jelenleg is folyamatban van.A kisérletsorozat még véglegesen nem zárult le. Az előállitott származékok elegendők ahhoz, hogy a kiindulási vegyületnek a demetoxitylophorinnak meg tudtuk határozni, mely helyei, aktiv csoportjai felelősek a fungicid hatás létrehozásáért. A származékok között található több olyan közepes hatásu vegyület, melyek fotostabilak, és nem

toxikusak. A kisérlet megindulásakor ezt a kettős problémát szerettük volna megoldani. A hatásosnak bizonyult vegyületek iránt a Chinoin gyógyszergyár érdeklődést tanusitott, mely azt eredményezheti, hogy ezek közül egy-kettő forgalomba is kerülhet.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A demetoxitylophorin lokalizációja a növényen belül

A demetoxitylophorinnak azt a tulajdonságát használtam fel a növenyen belül a vegyület lokalizációjának megállapitására, hogy UV fényben sárgás szinü fluoreszcens fényt bocsát ki. Kétféle eljárással készitettem metszeteket, hogy az alkaloidok pontos helyét meg tudjam állapitani a Cyn.vincetoxicum különböző szerveinek szöveteiben.

Az egyik metszet hagyományos celluidines beágyazással készült. Ezeket a metszeteket kontrollként állitottam be. A celluidines beágyazást a Kisser/1926/-féle módszerrel végeztem: a megtisztitott, megfelelő részekre vágott növényi szerveket elóször viztelenités céljából 8o %-os etanolban tartottam három napig, majd abszolut alkoholba helyeztem két napra. Ezt követte az előkészités, melynek során a metszeni kivánt részeket egy napra abszolut alkohol:éter 1 : 1 arányu elegyébe tettem. Az igy előkészitett anyagot át kellett itatni celluidinnal. Először 2 %-os celluidin oldatba tettem három napra, majd 4 %-os celluidin oldatba két napon keresztül, és ezt 8 %-os celluidin oldatba történő kezelés követte két napig. Az átitatás után a beágyazás következett. Az átitatott anyagot exikátorba helyezzük egy napra, ahol a blokkok megszilárdulnak, majd a fiolák 7o %-os alkoholba kerülnek metszésig. A mikrotomról lekerült metszetek 7o %-os

alkoholba kerülnek. A preparátumok készitéséhez a metszetek celluidin tartalmát el kell távolitani. Ezt a müveletet a Sárkány-Szalai: Növényszervezettani gyakorlatok 581. oldalon leirtak alapján végeztem. A celluidintól megtisztitott metszetek Ehrlich féle savanyu hematoxilin festéssel készitettem elő fényképezéshez. A festési eljárás szintén a Sárkány-Szalai: Növényszervezettani gyakorlatokban leirtak alapján készült.

A növényi sejtekből természetesen minden sejtalkotó kioldódik a falon kivül, igy ezeken a metszeteken csak azt tanulmányozhatjuk, összehasonlitva az UV fényben vizsgált parafinos beágyazással készült metszetekkel , hogy mely sejtek raktározták az alkaloidákat.

A fent emlitett eljárás hátrányát volt hivatva kiküszöbölni a parafinos beágyazással készitett metszetek. Az eljárás lényege, hogy méhviaszt és parafint 1:1 arányban felolvasztok, majd képlékeny állapotura lehütöm. Az igy kapott könnyen kezelhető viaszba ágyazom a növényi részeket, ugy hogy szorosan rátapadjanak. Csapvizbe teszem az igy elkészitett blokkot, amig megszilárdul, majd falapokra erősitem, hogy a mikrotomba be lehessen fogni. A metszeteket tárgylemezre helyezem és napfénnyel kezelem addig, mig az UV lámpa fényében sárgás fénnyel nem fluoreszkálnak az alkaloidot tartalmazó sejtek. Ezt követően mikroszkoppal megállapitom a demetoxitylophorin pontos lokalizációját.

A fényképezéshez Zeiss-gyártmányu UV lámpát és

kutató mikroszkopot használtam. 2,6/0, 07 Planakromat objektivvel és MF-Projektiv K 4:1 okulárral dolgoztam. A fényékezőgép zárja előtt lévő okulárra sárga szinü szinszürőt helyeztem.Az UV fényt BG_3 jelzésü szinszürővel állitottam elé. A megvilágitás ideje 1o-2o-4o-6o perc volt.

3.2. A demetoxitylophorin előállitása

Ledarált Cyn.vincetoxicum gyökereket izopropanolban áztattam.Négy-öt nap állás után az extraháló oldószerként alkalmazott izopropanolból és 1 %.HCl oldatból 3oo-3oo ml-t öntöttem a gyökér 2oo g-jához. Visszafolyós hütővel 2o percig extraháltam. A gyökérre a savas-izopropanolos extrahálás után 6oo ml 1 %-es sósav oldatot öntöttem,és 25 percig további extrahálásnak tettem ki. Külön gyüjtöttem a savas izopropanolos,és külön a savas extraktumokat. Továbbiakban mindkét extraktum 1ooo - 1ooo ml-ét választó tölcsérbe öntöttem és 1oo-1oo ml széntetrakloridot és annyi 5 %-os NaOH oldatot adtam, hogy az oldatok pH-ja 9-es legyen. Ezek után mindkét extraktumot /savas izopropanolos és csak savas/ azonos módon kezeltem. Az oldatok öt perces alapos összerázása után rövid idő elteltével különváltak a vizes és a szerves fázisra. A szerves fázist leengedtem és a vizes fázishoz 1oo ml széntetrakloridot adtam, erősen összeráztam, és hagytam szétválni két fázisra. Az összegyüjtött szerves fázisokhoz 1-1 arányban 9-es pH-ra beállitott

deszt.vizet adtam, összeráztam, és lo órát hagytam állni. Az összegyüjtött szerves fázisokat Rotavapor készülék segitségével bepároltam.

A süritményből állás közben demetoxitalophorin kristályok váltak ki, melyet G 2-es szürővel különválasztottam, és acetonból kikristályositottam. A süritmény meg - maradt részéhez 1 - 1 arányban forró acetont adtam oldószerként, és preparativ rétegre felvittem.

A következőkben ismertetem a preparativ réteg és futtató elegyek összetételét:

A preparativ réteg összetétele:

loo g szilikagél G

37 g szitált gipsz

25o ml deszt.viz

Az igy kapott szuszpenziót 3 db 45o cm^2 területü alkohollal megtisztitott üveglemezre vittem fel. A lemezeket 24 órán át szobahőmérsékleten száritottam, majd llo C^o-on egy órát aktiváltam. Az extraktumot biopipettával vittem fel a lemezre az alaptól 1.5 cm távolságra start vonalat képezve. Felvitel közben meleg levegős ráfuvást alkalmaztam. Előkisérletekkel megállapitottam, hogy milyen mennyiséget szükséges felvinni a lemezre ahhoz, hogy a szétválás tökéletes legyen.

A futtatóelegy összetétele:

1. savas futtató:

benzol: ecetsav = lo:1

2. nem savas összetételü futtató:

Benzol : 96 %-os etanol = lo : 2

A savas rendszerü futtatóban egymásután kétszer futtattam, közben kiszáritottam meleg levegő ráfuvásával a lemezeket. A benzol : etanolos futtatás után a lemezekre olyan maszkot helyeztem, melyekből 3 egymással párhuzamos csikot kivágtam. A csikok 1 cm x 15 cm méretüek voltak, és merőlegesek a startvonalra. 256 nm hullámhosszuságu UV sugárzás hatásának tettem ki az igy előkészitett lemezeket. A megvilágitott helyeken sárga szinben fluoreszkált a vegyület, igy könnyen megjelölhetővé vált elhelyezkedése a preparativ rétegen. Ezeket a helyeket összekötve be tudtam jelölni azt a területet, ahol az alkaloida található. A bejelölt helyeken a vegyületet tartalmazó szilikagélt lekapartam, acetonnal eluáltam, majd átdesztillált acetonból kikristályositottam a vegyületet.

3.3. Demetoxitylophorin bontása különböző oldószerekben, a bontott termék előállitása és aktivitásának meghatározása

3.3.1. Demetoxitylophorin bontása 2,4,6,8-as pH-ju foszfát pufferben

A puffereket Sörensen szerint készitettem. Mind a négy különböző pH-ju oldatba annyi alkaloidot vittem be, hogy lo µg-ot tartalmazott ml-ként.46ooo lux erősségü

napfény sugárzásának vetettem alá az oldatokat. 5 percenként vettem időmintákat 0 - 1oo percig. Spektromom 2o2 fotométeren 4o4 nm-nél mértem az időminták extincióját. Az összehasonlitó oldat a megfelelő pH-ju puffer volt. A 4o4 nm elnyelési maximum értéket egy előző kisérlet alapján állapitottam meg.

3.3.2. Demetoxitylophorin bontása széntetrakloridban, kloroformban, metanolban

Mind a három oldószerből olyan törzsoldatot készitettem, ami ml-ként 1o µg demetoxitylophorint tartalmazott. A különböző oldószerekbe vitt demetoxitylophorint 5oooo lux erősségü napfényen bontöttam. 5 percenként vettem időmintákat 0 - 7o percig. Spekrtomom 2o2 fotométerrel, 4o4-4s nm-nél mértem az extinciókat mind a három oldószer minden időmintájánál.

3.3.3. Demetoxitylophorin bontása különböző hullámhosszuságu fénnyel

Metanolban 5oo µg pro ml-es törzsoldatot készitettem, és ebből 0,1 ml-t vittem fel szilikagélből készült vékony rétegre foltonként. A vékony réteg a következő eljárással készült: szilikagél G és viz 1:3 arányu elegyét alaposan elkevertem, 1o - 15 percig, hogy homogén legyen, majd 2o x 4 cm méretü, alkohollal megtisztitott üveglapra

2,5 ml-t pipettával felvittem. A lemezeket 24 óráig szobahőmérsékleten szárítottam, ezt követően 1o5 C°-on egy óráig aktiváltam, a kész lemezeket pormentes helyen tároltam. A vékonyrétegre felvitt hatóanyagot, mely 0,8 mm átmérőjü foltokat képezett, a következő jénai gyártmányu szinszürőkkel takartam le:

A szinszürő száma	Átengedett fény hullámhossza
UG 1/1,5	3o2 - 4o5
GG 13/2	3o9 -
GG 11/2	42o -
VG 4/2	436 -
BG 12/2	32o - 5o9
OG 2/2	54o -
RG 2/4	578 -
tárgylemez	
fekete papir	
letakaratlan kontroll	

3.3.4. A bontott termék előállitása, és aktivitásának meghatározása

5 ml széntetrakloridba 2o mg demetoxitylophorint mértem be, és 6oooo luxon 5o percig bontottam. A bontott termék pelyhes csapadék formájában kicsapódott. Sch.Sch. AG 8714 Feldbach ZH fehér csiku papiron megszürtem, hideg széntetrakloriddal háromszor átmostam. A csapadékot kloroformban feloldottam, és preparativ rétegen megfuttattam.

A preparativ réteg ugyanugy készült, mint azt a vegyület előállításánál leirtam.

A futtatóelegy összetétele:

$CHCl_3$: 96 %-os etanol : ammonia : deszt.viz =

1:9:2:1

A bontott termék a lemez középső részén helyezkedett el, melyet UV lámpa alatt pontosan be lehet jelölni. A bontott terméket tartalmazó sávot lekapartam, oszlopba vittem, acetonnal eluáltam, majd bepároltam.

A bepárolt bontott terméket, és kontrollként a demetoxitylophorint egymás mellé felvittem -25 µg-t foltonként- szilikagél G-ből készült vékonyrétegre, mely azonos módon készült a fentebb leirtakkal. $CHCl_3$:96 %-os etanol: ammonia:deszt.viz = 1:9:2:1 arányu futtató rendszerben megfuttattam, majd szárítás után a következő összetételü táptalajt rétegeztem rá:

agar 3 %

glukoz 1 %

élesztőkivonat 0,5 %

$CaCO_3$ precipitátum 5 %

A megdermedt táptalajra steril ecsettel Aktinomucor repens 10 napos, Sacharomyces cerevisiae 48 órás telepéről készült szuszpenziót vittem fel. 30 C^o-on 24 óráig inkubáltam.

Földeák és mts által előállitott bontott származékokat a"Származékok aktivitásának vizsgálata" c fejezetben irtam le. Ezeket a származékokat az ott közölt 12 mikro-

organizmusra néztem meg, aktivitásuk meghatározása céljából.

3.4. A vegyületek gátló hatásának vizsgálata

A kisérletek során több mint 160 származékot vizsgáltunk meg a későbbiekben felsorolt teszt mikroorganizmusokkal abból a célból, hogy baktericid, fungicid hatásukat megállapitsuk. Ezeknek a származékoknak egyrésze valamely vegyület előállitásának a közti terméke volt, igy ezeket a táblázatok nem tartalmazzák. A vegyületek közül az /1/ és a /3/ Indiából /Presidency College,Madras/ származik, a /2/-t én állitottam elő, a többit a JATE Szerveskémiai Intézetében Földeák és Hegyes szintetizálták. A szintetizálás tervszerüen, az aktivitás figyelembevételével történt. Az egész kisérletsorozat a demetoxitylophorinra épült, mint a növényből izolált, nagyhatásu, szélesspektrumu antibiotikumra. Rendkivül nagy fungicid hatása ellenére sem lehet azonban sem növényvédőszerként, sem az állati, vagy emberi gyógyászatban antibiotikumként alkalmazni, mert erősen toxikus és fotolabilis.

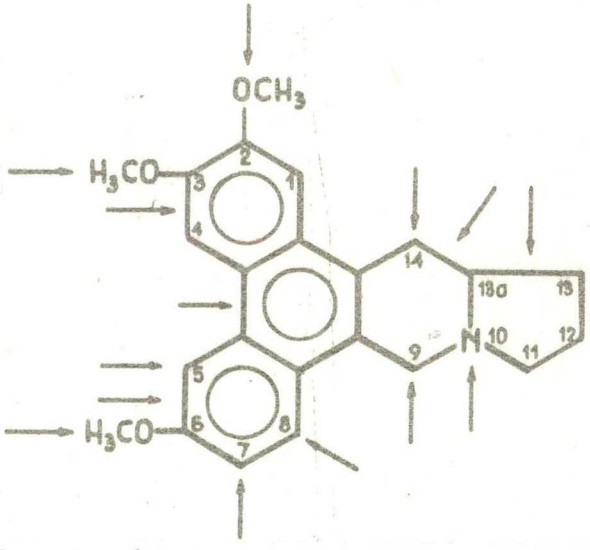
A származékok szintetizálásánál a fő célunk az volt, hogy előállitsunk olyan vegyületeket, melyeknek fény hatására nem változik meg strukturája, és ami ezzel együtt jár, aktivitása sem csökken, és ne legyen toxikus, vagy

vagy csak olyan kis mértékben -elvégre minden gyógyszer méreg is- hogy abban a szervezetben, melyet védeni akarunk, ne idézzen elő fiziológiai változást.

Nem elhanyagolandó az a szempont sem, hogy a demetoxitylophorin szintézise 14 lépéses reakció sorozatból áll, és alapanyagként rendkivül drága importanyagot kell alkalmazni. Igyekeztünk ezt a tényezőt ugy módositani, hogy minél kevesebb reakcióval kelljen a hatóanyagot előállitani, mert minden reakciónál a végtermék kinyerési százaléka erősen csökken.

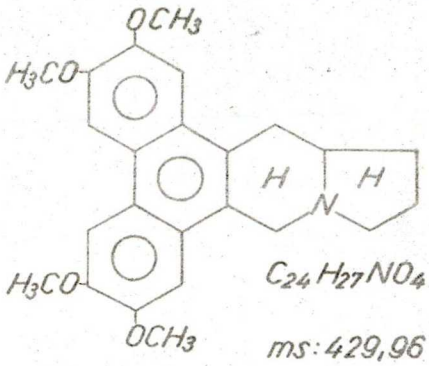
Utoljára, de nem utolsósorban, mint már a bevezetőben is emlitettem, az volt a célunk, hogy megállapitsuk, mely szubsztituensek, aktiv centrumok felelősek a rendkivül nagy hatásért.

Ezen kérdések megválaszolására a fentebb emlitett szempontok figyelembe vételével a következő változtatásokat eszközöltük a molekula szerkezetében:



7.ábra A demetoxitylophorin molekula szerkezetében eddig eszközölt változtatásokat a nyilak jelzik

Tylophorin származékok

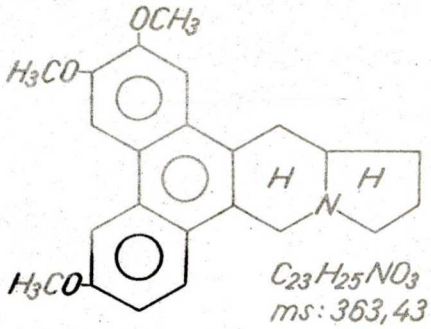


$C_{24}H_{27}NO_4$

ms: 429,96

op: 278°

1



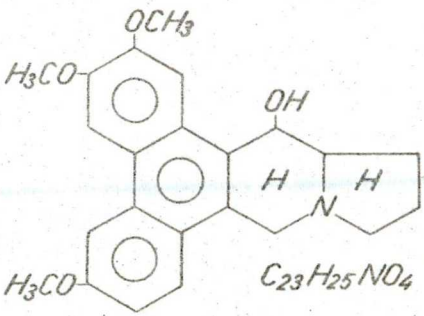
$C_{23}H_{25}NO_3$

ms: 363,43

op: 212-214°

pK_s: 7,25

2

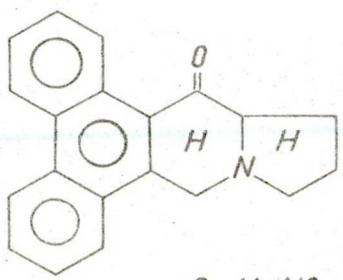


$C_{23}H_{25}NO_4$

ms: 394,46

op: 245°

3

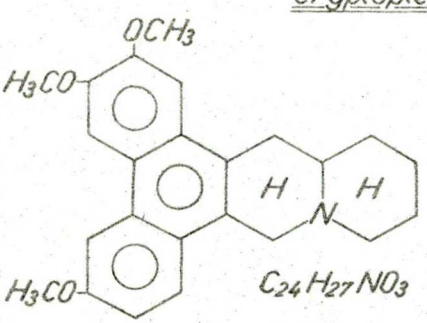


$C_{20}H_{17}NO$

ms: 287,32

4

Cryptopleurin származékok



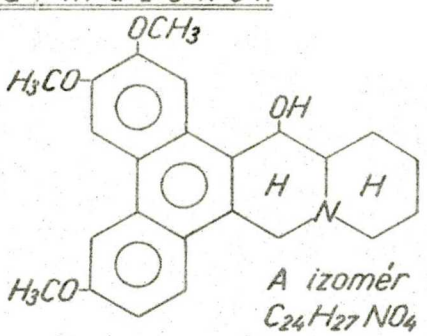
$C_{24}H_{27}NO_3$

ms: 377,488

op: 197-198°

pK_s: 7,35

5



A izomér

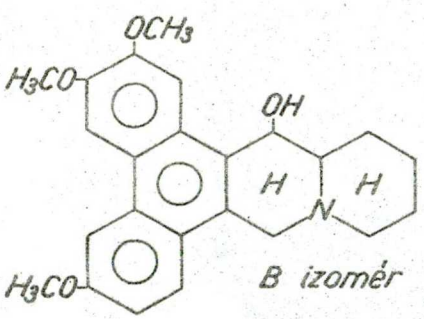
$C_{24}H_{27}NO_4$

ms: 393,488

op: 236-237°

pK_s: 7,86

6



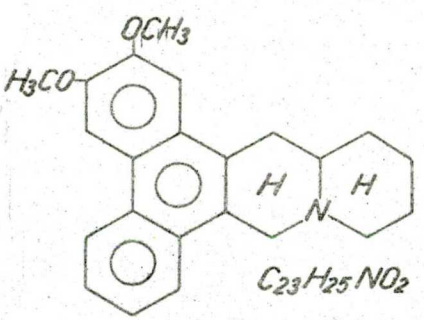
B izomér

ms: 393,488

op: 208-209°

pK_s: 7,38

7



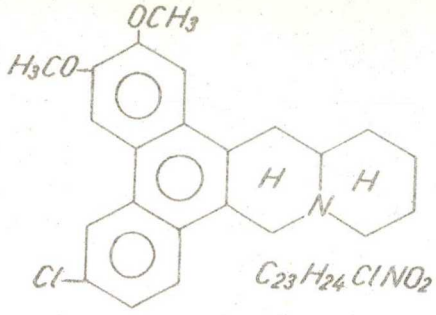
$C_{23}H_{25}NO_2$

ms: 347,461

op: 188-189°

pK_s: 7,27

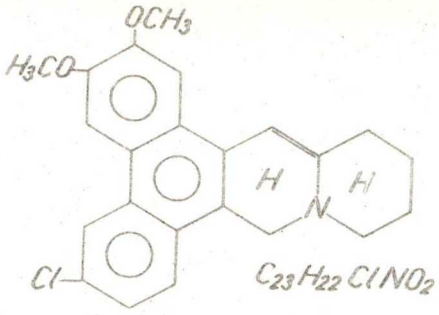
8



$C_{23}H_{24}ClNO_2$

9

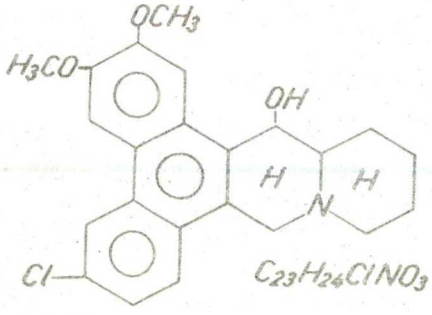
ms: 381,910



$C_{23}H_{22}ClNO_2$

10

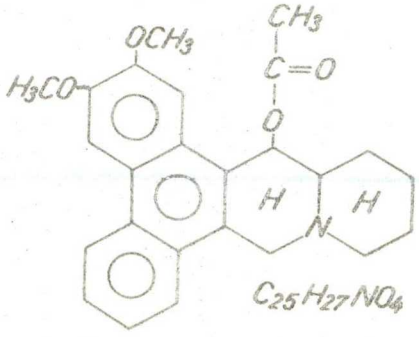
ms: 379,894



$C_{23}H_{24}ClNO_3$

11

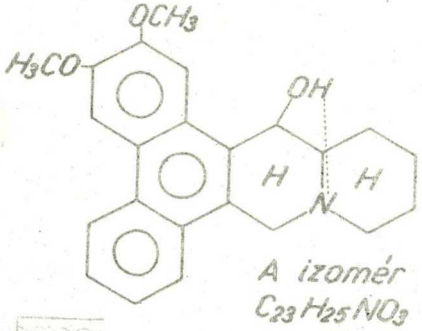
ms: 397,910
op: 233 – 235°
pKs: 7,69



$C_{25}H_{27}NO_4$

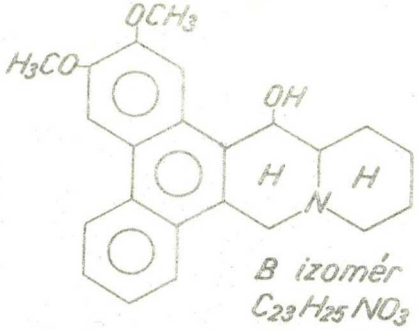
12

ms: 404,491



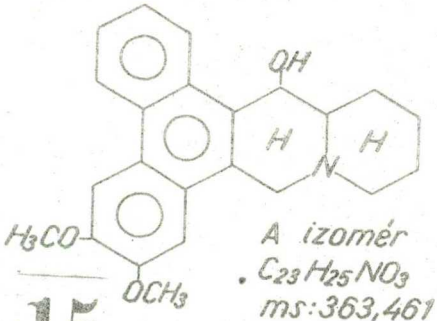
A izomér
$C_{23}H_{25}NO_3$
ms: 363,461
op: 250 – 251°
pKs: 7,33

13



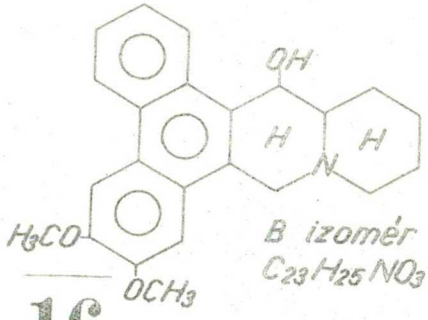
B izomér
$C_{23}H_{25}NO_3$
ms: 363,37
op: 266 – 267
pKs: 7,85

14



A izomér
$C_{23}H_{25}NO_3$
ms: 363,461
op: 201 – 203°
pKs: 7,27

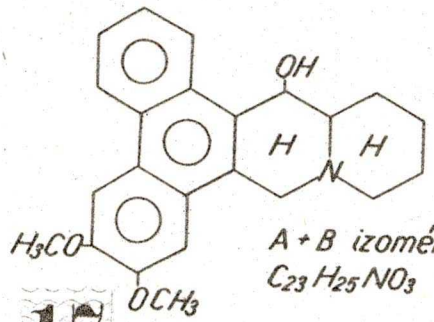
15



B izomér
$C_{23}H_{25}NO_3$

ms: 363,37
op: 227 – 228°

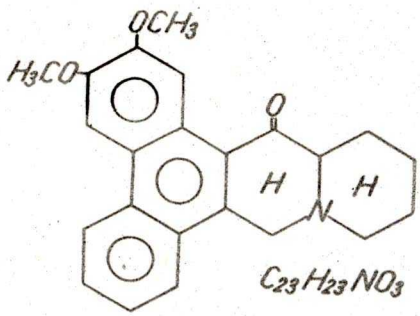
16



A + B izomér
$C_{23}H_{25}NO_3$

17

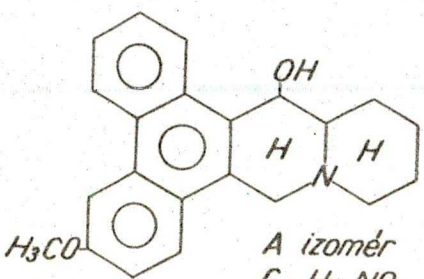
ms: 363, 461



$C_{23}H_{23}NO_3$

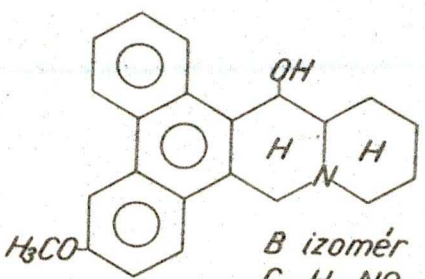
18

ms: 361, 445



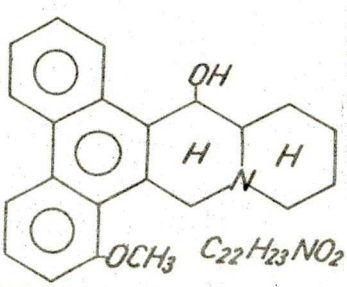
A izomér
$C_{22}H_{23}NO_2$
ms: 333, 434
op: 208 - 209°
pK_s: 7, 43

19



B izomér
$C_{22}H_{23}NO_2$
ms: 333, 434
op: 215 - 216°
pK_s: 7, 50

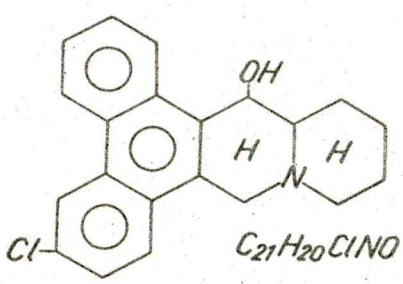
20



$C_{22}H_{23}NO_2$

21

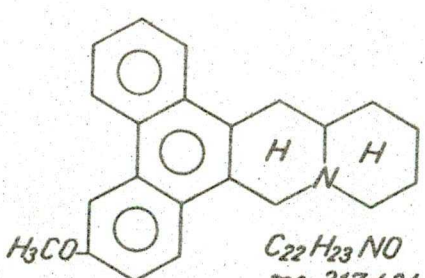
ms: 333, 434
op: 253 - 255°



$C_{21}H_{20}ClNO$

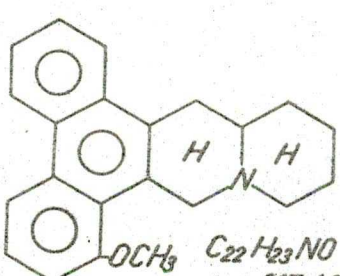
22

ms: 343, 856
op: 238 - 242°



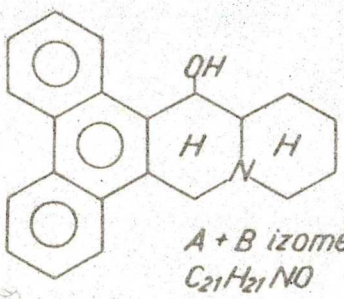
$C_{22}H_{23}NO$
ms: 317, 434
op: 161°
pK_s: 7, 45

23



$C_{22}H_{23}NO$
ms: 317, 434
op: 170°
pK_s: 6, 87

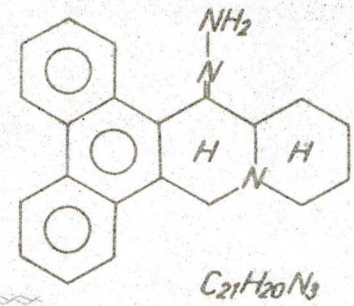
24



A + B izomér
$C_{21}H_{21}NO$

25

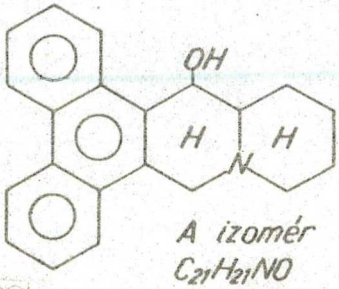
ms: 303,407



$C_{21}H_{20}N_3$

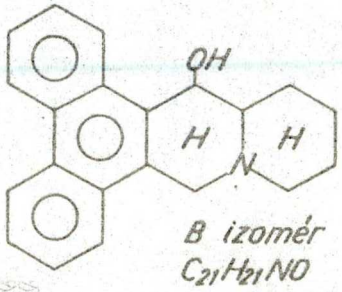
26

ms: 314,415



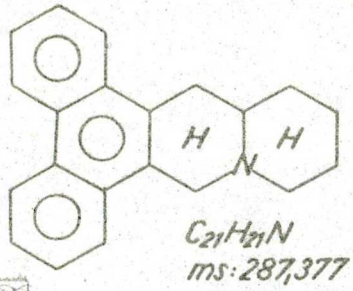
A izomér
$C_{21}H_{21}NO$
ms: 303,407
op: 231 - 232°
pKs: 7,48

27



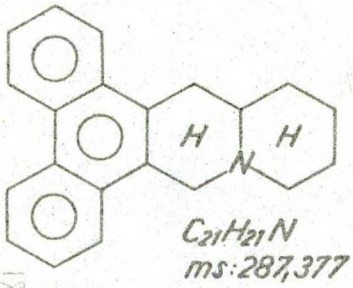
B izomér
$C_{21}H_{21}NO$
ms: 303,37
op: 231 - 233°
pKs: 7,95

28



$C_{21}H_{21}N$
ms: 287,377
op: 174 - 175°
pKs: 7,51

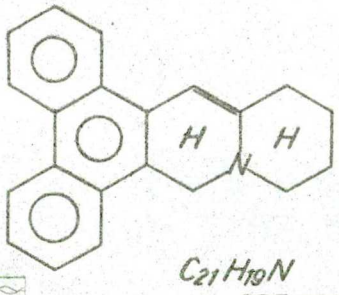
29



$C_{21}H_{21}N$
ms: 287,377

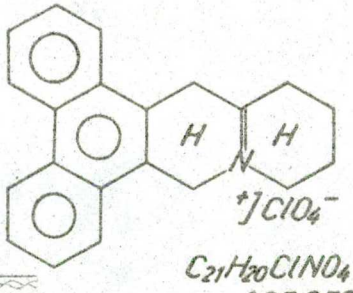
pKs: 7,51

30



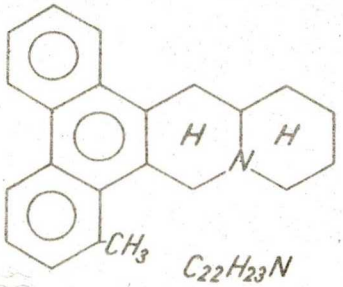
$C_{21}H_{19}N$
ms: 285,381

31



$C_{21}H_{20}ClNO_4$
ms: 385,856

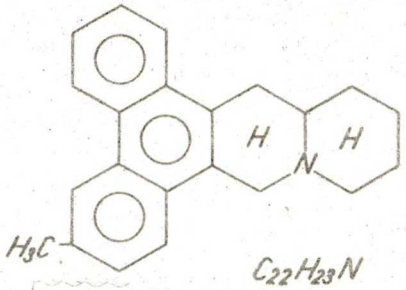
32



33

$C_{22}H_{23}N$

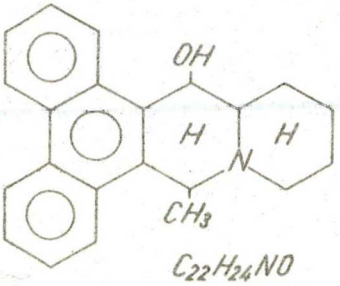
ms: 300,426



34

$C_{22}H_{23}N$

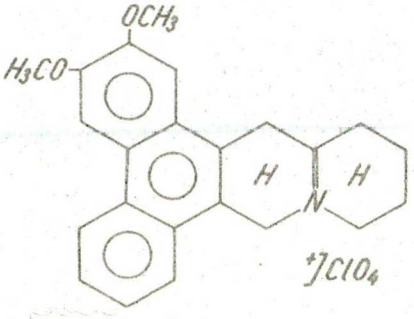
ms: 300,426



35

$C_{22}H_{24}NO$

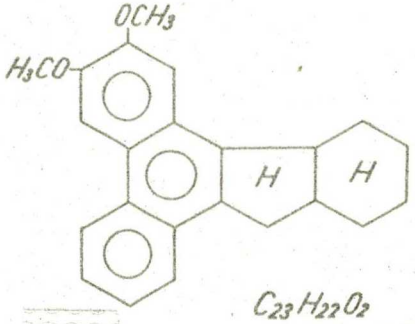
ms: 316, 426



36

$C_{23}H_{24}NO_6Cl$

ms: 445, 918

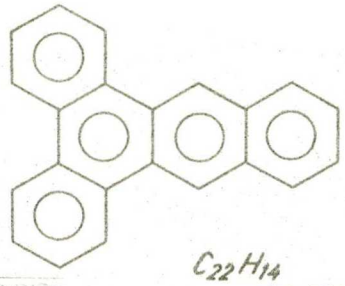


37

$C_{23}H_{22}O_2$

ms: 330,429

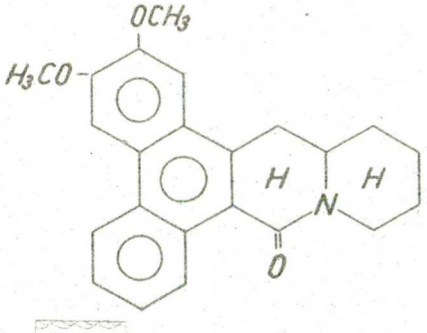
op: 155 - 156°



38

$C_{22}H_{14}$

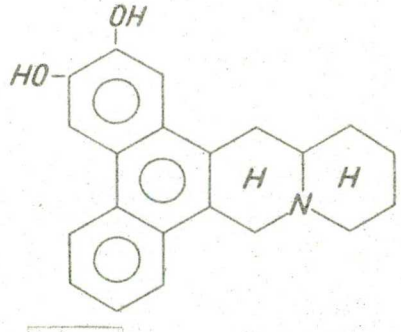
ms: 384,372



39

$C_{23}H_{23}NO_3$

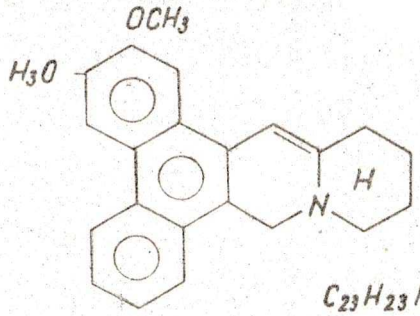
m: 359,35



40

$C_{21}H_{21}NO_2$

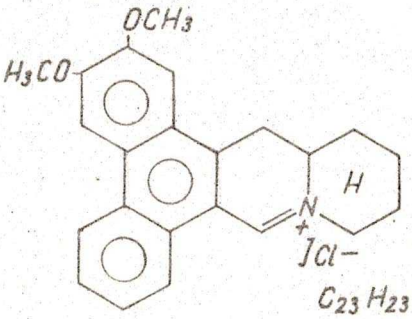
m: 319,40



$C_{23}H_{23}NO_2$

ms: 345,37

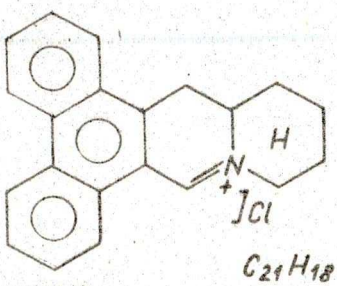
41



$C_{23}H_{23}ClNO_2$

ms: 380,87

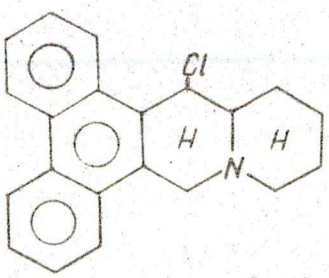
42



$C_{21}H_{18}ClN$

ms: 319,86

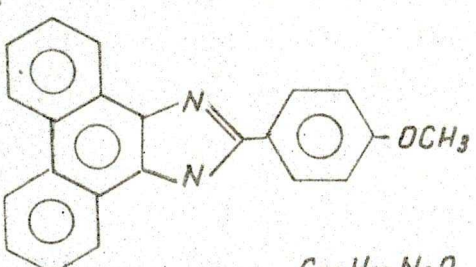
43



$C_{21}H_{20}ClN$

ms: 321,87

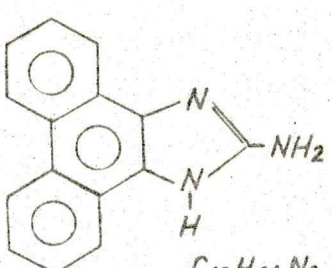
44



$C_{22}H_{16}N_2O$

ms: 324,38

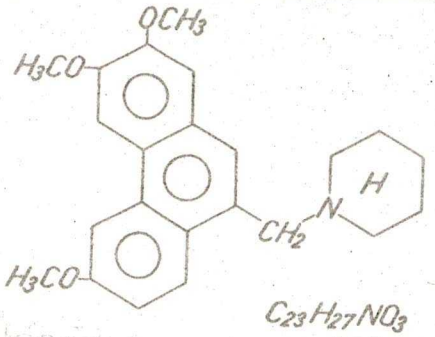
45



$C_{15}H_{11}N_3$

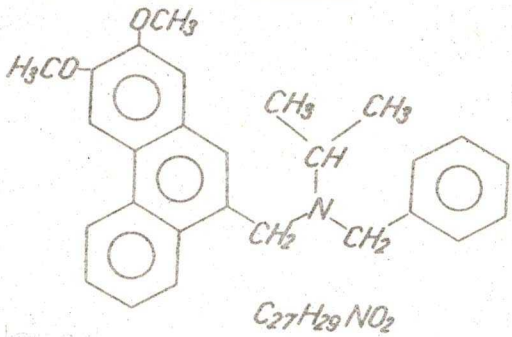
ms: 233,27

46



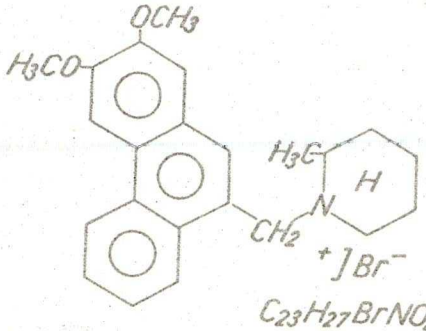
47

$C_{23}H_{27}NO_3$
ms: 365,477
op: 170-171°



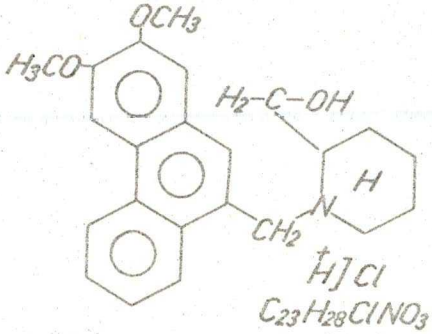
48

$C_{27}H_{29}NO_2$
ms: 499,55
op: 113-114°



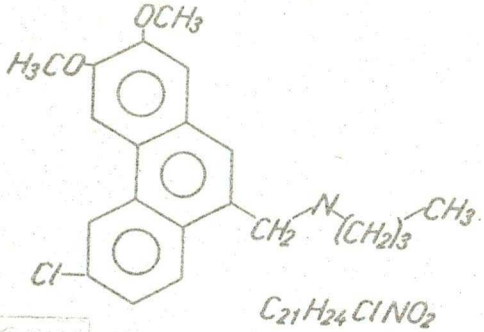
49

$C_{23}H_{27}BrNO_2$
ms: 429,393
op: 189-191°



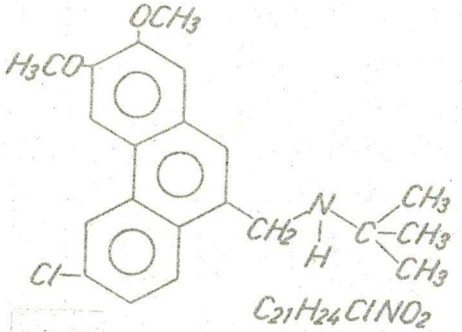
50

$C_{23}H_{28}ClNO_3$
ms: 401,942
op: 234-235°



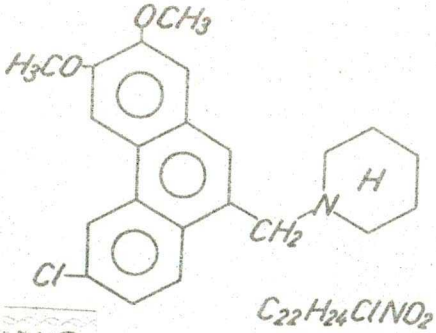
51

$C_{21}H_{24}ClNO_2$
ms: 357,73
op: 100-101°
pK_s: 7,70



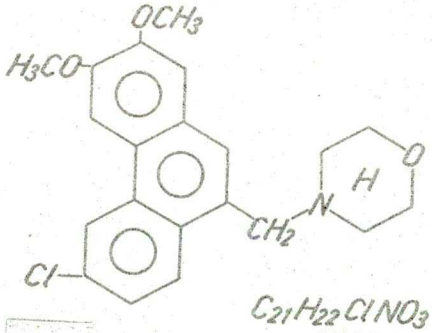
52

$C_{21}H_{24}ClNO_2$
ms: 357,73
op: 119,5-120°
pK_s: 8,16



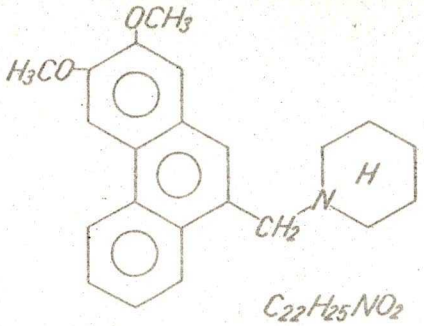
53

$C_{22}H_{24}ClNO_2$
ms: 369,89
op: 165-166°
pK_s: 6,80



54

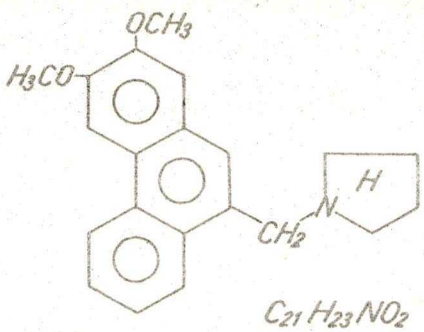
$C_{21}H_{22}ClNO_3$
ms: 371,812
op: 155-156°



55

$C_{22}H_{25}NO_2$

ms: 335,460

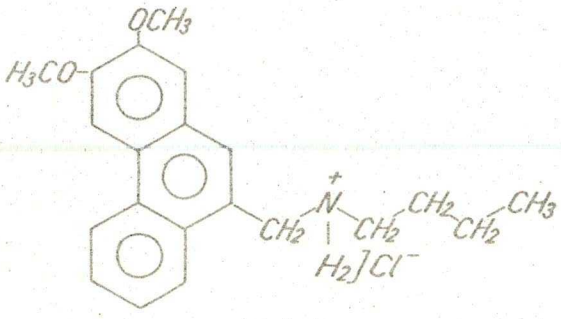


56

$C_{21}H_{23}NO_2$

ms: 321,423

op: 131 - 131,5°

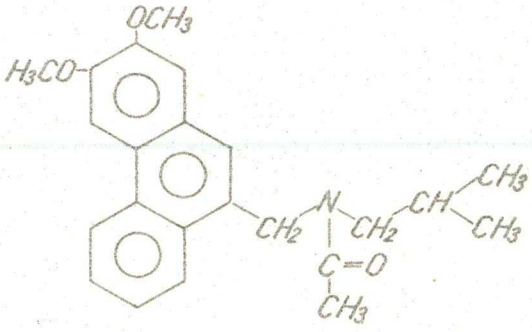


57

$C_{21}H_{26}ClNO_2$

ms: 359,904

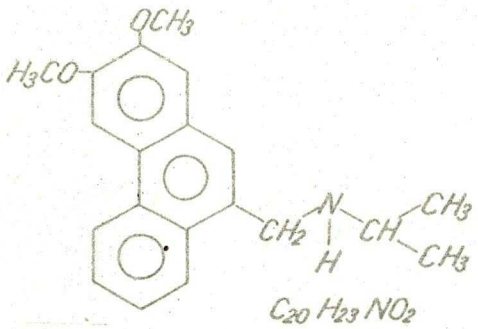
op: 214 - 216°



58

$C_{22}H_{27}NO_3$

ms: 353,456

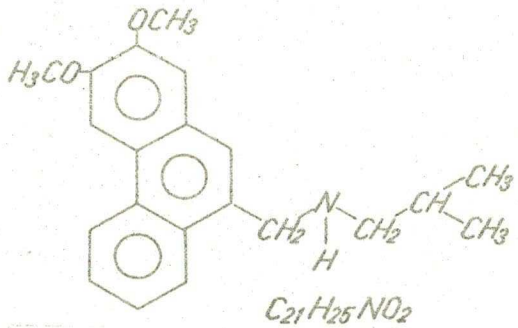


59

$C_{20}H_{23}NO_2$

ms: 309,412

pK_s: 7,76



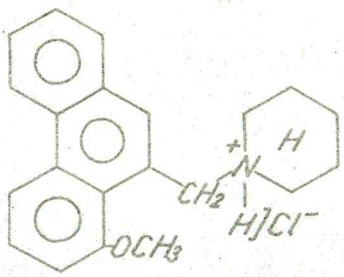
60

$C_{21}H_{25}NO_2$

ms: 323,239

op: 147°

pK_s: 7,61

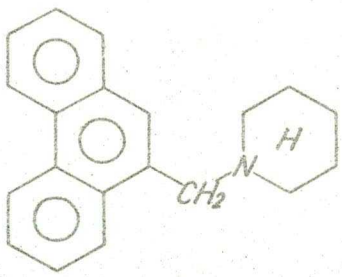


61

$C_{21}H_{24}ClNO$

ms: 341,88

op: 210°

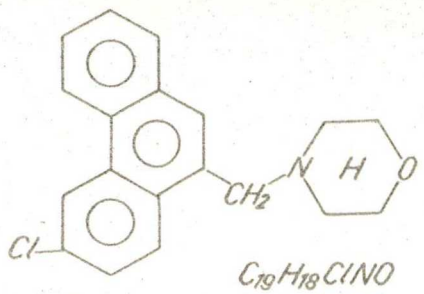


62

$C_{20}H_{21}N$

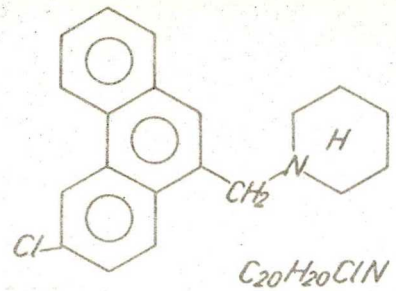
ms: 275,396

op: 111 - 113°



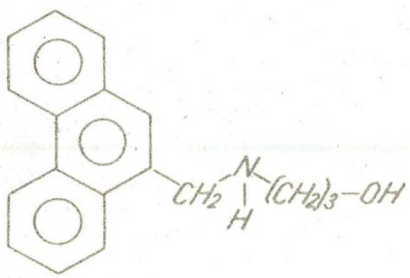
$C_{19}H_{18}ClNO$
ms: 311,87
op: 115-116°

63.



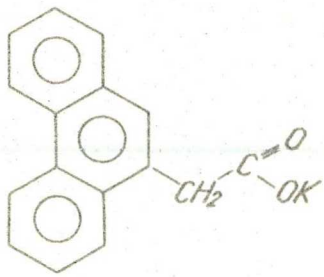
$C_{20}H_{20}ClN$
ms: 309,845
op: 114-114,5°

64.



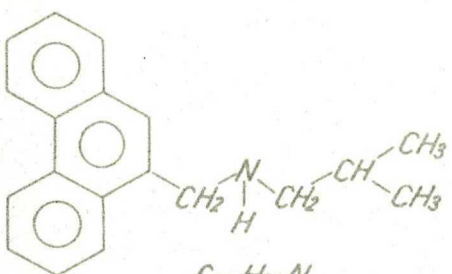
$C_{18}H_{19}NO$
ms: 262,28

65.



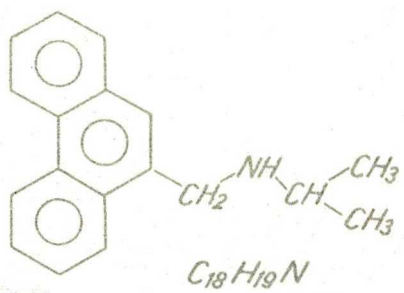
$C_{16}H_{11}O_2K$
ms: 274,364

66.



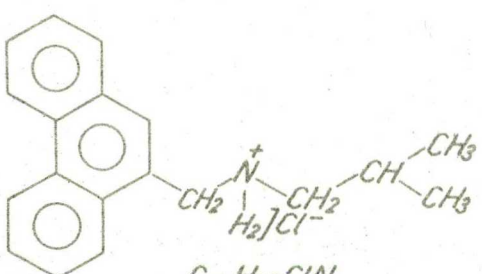
$C_{19}H_{21}N$
ms: 263,385
op: 89-90°
pK_S: 7,40

67.



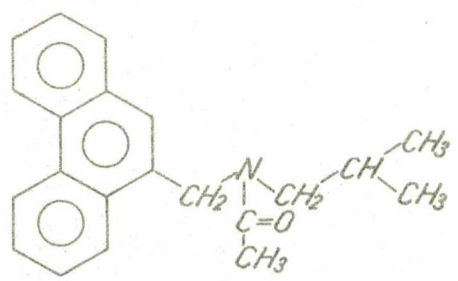
$C_{18}H_{19}N$
ms: 249,358
op: 40-41°
pK_S: 8,13

68.



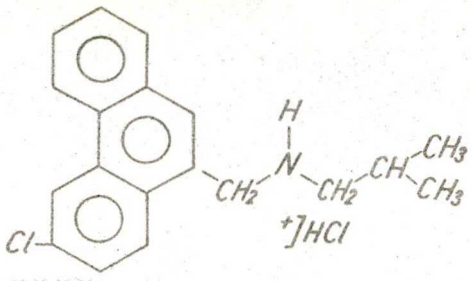
$C_{19}H_{22}ClN$
ms: 299,85
op: 201-203°
pK_S: 7,40

69.



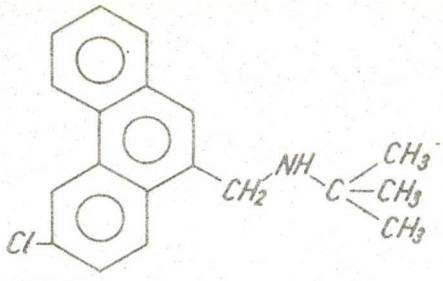
$C_{21}H_{23}NO$
ms: 305,423

70.



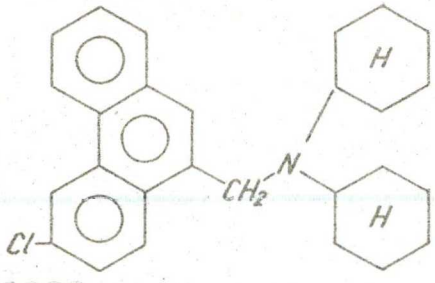
71

$C_{19}H_{21}NCl_2$
ms: 334,294



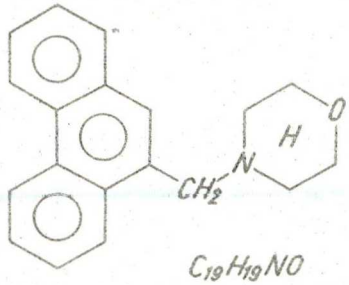
72

$C_{19}H_{20}NCl$
ms: 297, 834



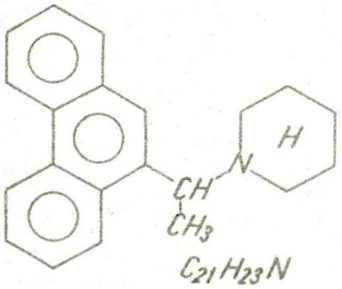
73

$C_{27}H_{34}NCl$
ms: 406, 018



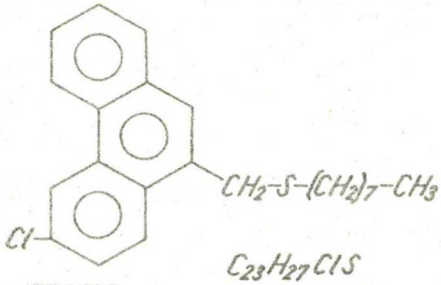
74

$C_{19}H_{19}NO$
ms: 278,377
op: 120 - 121,5°



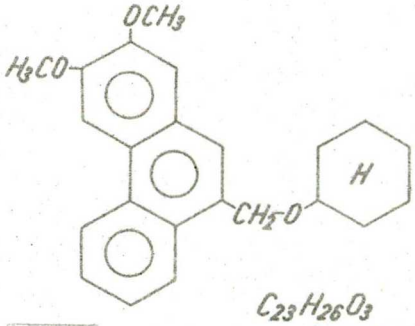
75

$C_{21}H_{23}N$
ms: 326, 926
op: 223 - 225°



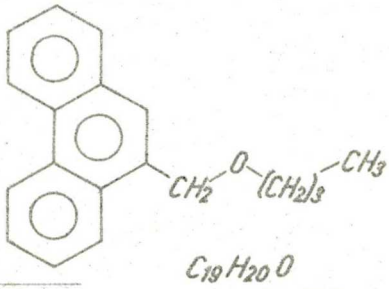
76

$C_{23}H_{27}ClS$
ms: 370, 963



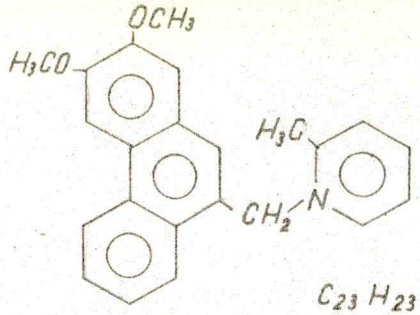
77

$C_{23}H_{26}O_3$
ms: 350,461
op: 125 - 125,5°



78

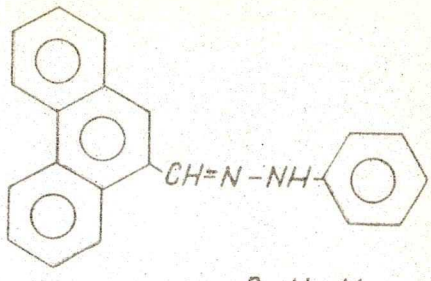
$C_{19}H_{20}O$
ms: 264, 369
op: 42 - 43°



$C_{23}H_{23}NO_2$

ms: 345,26

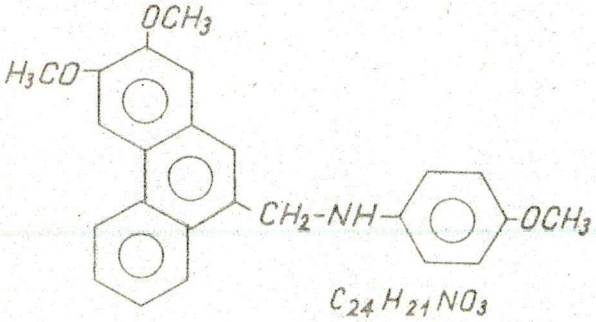
79.



$C_{21}H_{15}N_2$

ms: 293,24

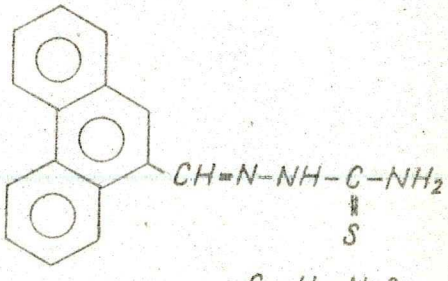
80.



$C_{24}H_{21}NO_3$

ms: 390,42

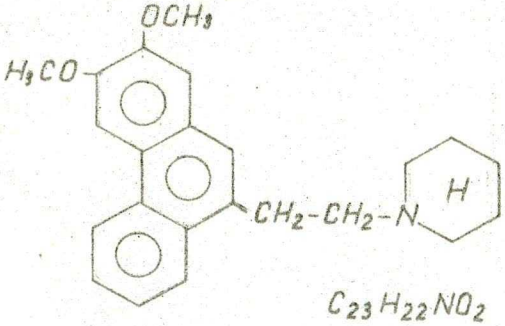
81.



$C_{16}H_{13}N_3S$

ms: 277,28

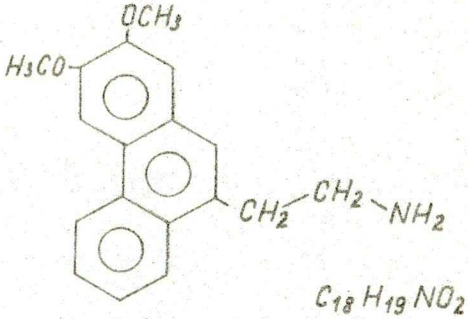
82.



$C_{23}H_{22}NO_2$

ms: 349,47

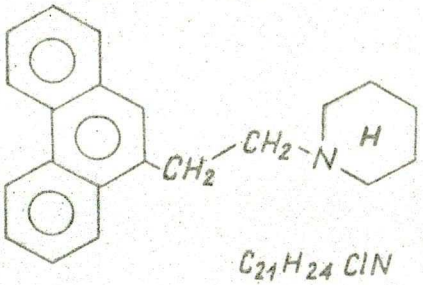
83.



$C_{18}H_{19}NO_2$

ms: 218,36

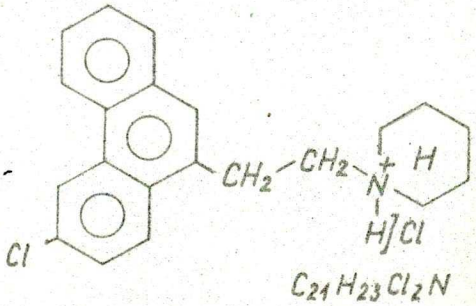
84.



$C_{21}H_{24}ClN$

ms: 325,87

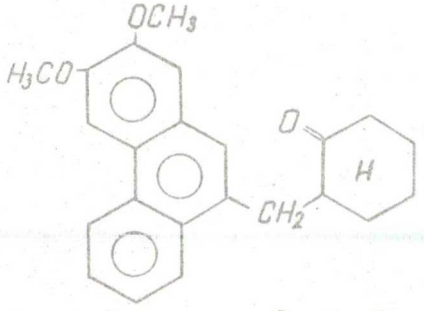
85.



$C_{21}H_{23}Cl_2N$

ms: 360,34

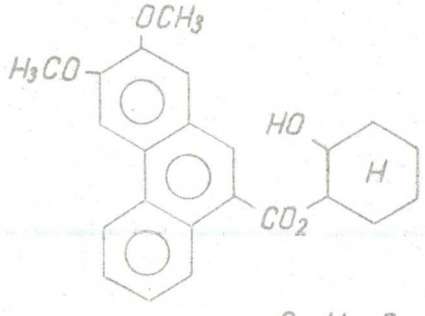
86.



$C_{23}H_{24}O_3$

ms: 348,44

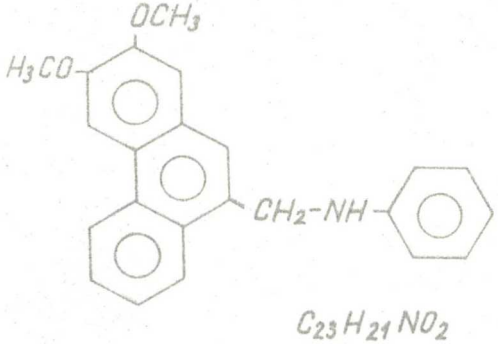
87



$C_{23}H_{25}O_3$

ms: 350,46

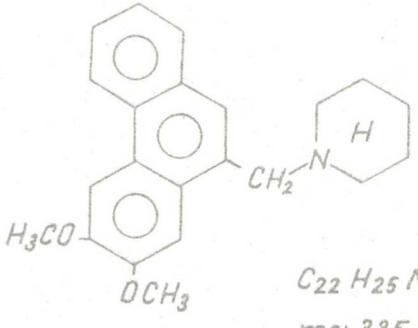
88



$C_{23}H_{21}NO_2$

ms: 359,42

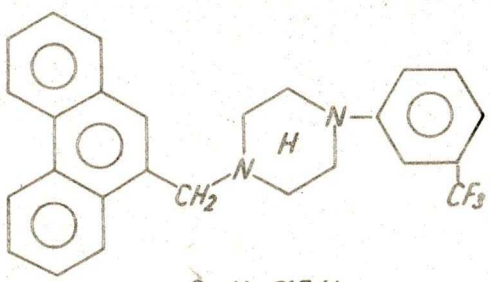
89



$C_{22}H_{25}NO_2$

ms: 335,46

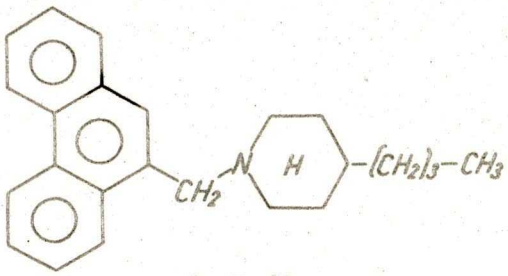
90



$C_{26}H_{22}ClF_3N_2$

ms: 453,92

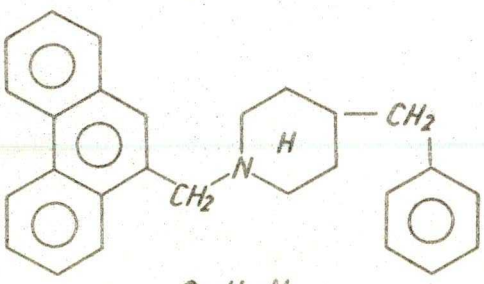
91



$C_{24}H_{29}N$

ms: 374,84

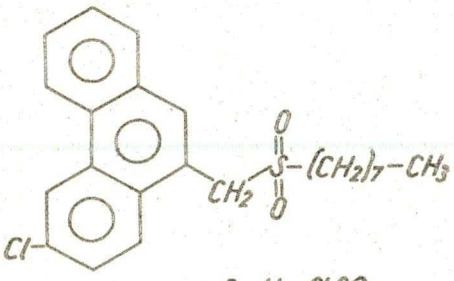
92



$C_{27}H_{27}N$

ms: 384,86

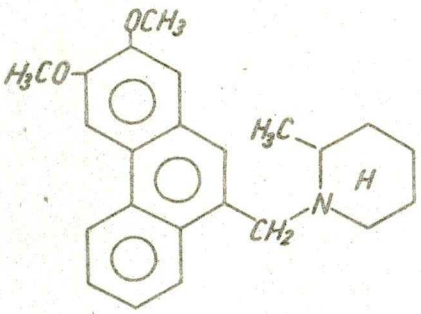
93



$C_{23}H_{27}ClSO_2$

ms: 401,19

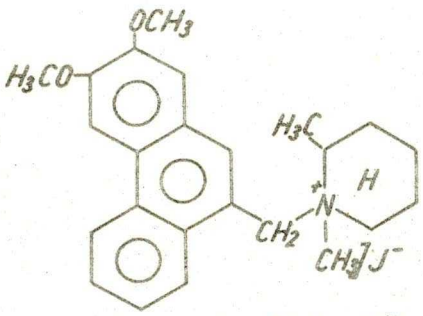
94



$C_{23}H_{26}NO_2$

ms: 348,46

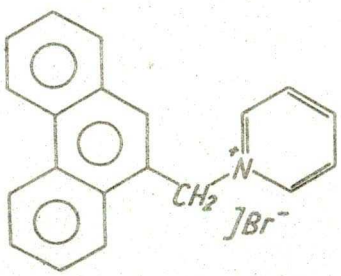
95



$C_{24}H_{32}JNO_2$

ms: 483,13

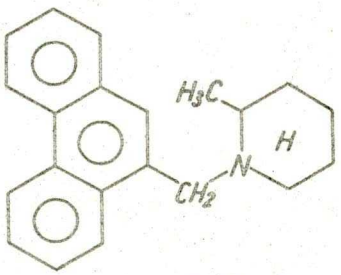
96



$C_{20}H_{19}BrN$

ms: 350,25

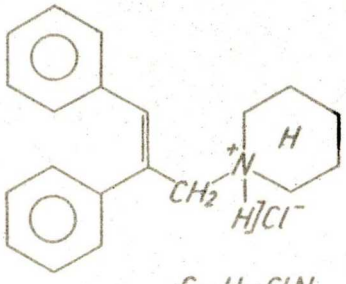
97



$C_{21}H_{22}N$

ms: 288,43

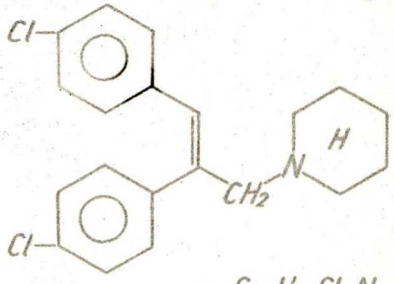
86



$C_{20}H_{24}ClN$

ms: 313,877

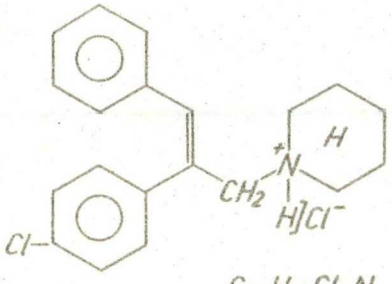
99



$C_{20}H_{21}Cl_2N$

ms: 346,310

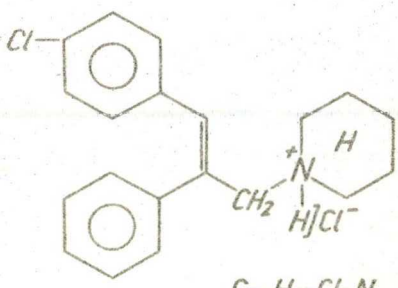
100



$C_{20}H_{23}Cl_2N$

ms: 348,326

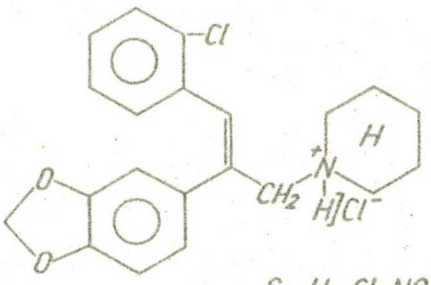
101



$C_{20}H_{23}Cl_2N$

ms: 348,326

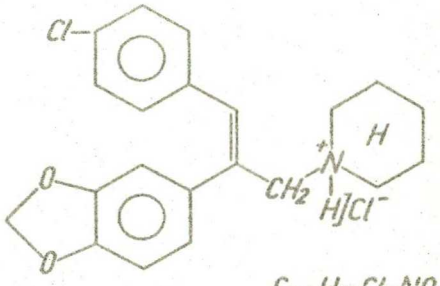
102



$C_{20}H_{21}Cl_2NO_2$

ms: 355,87

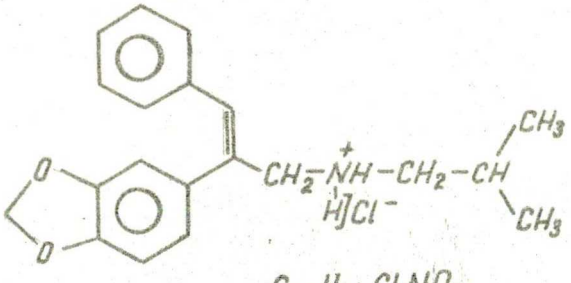
103



$C_{20}H_{21}Cl_2NO_2$

ms: 355,87

104

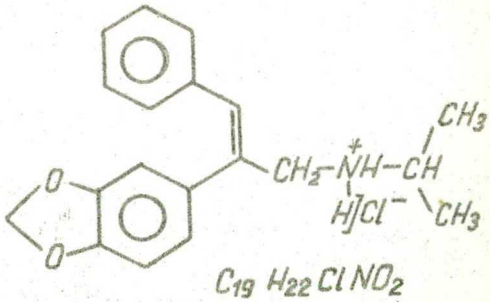


$C_{20}H_{24}ClNO_2$

ms: 345,87

op: 156 °C

105

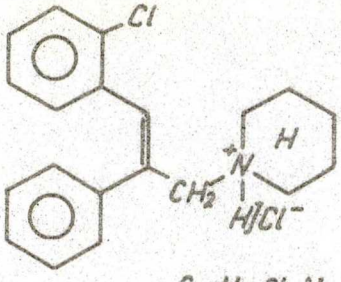


$C_{19}H_{22}ClNO_2$

ms: 331,85

op: 168 °C

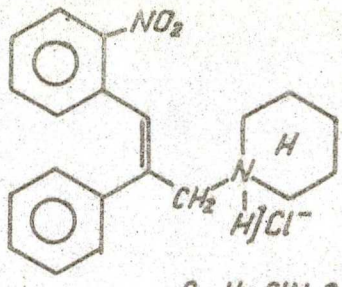
106



$C_{20}H_{23}Cl_2N$

107

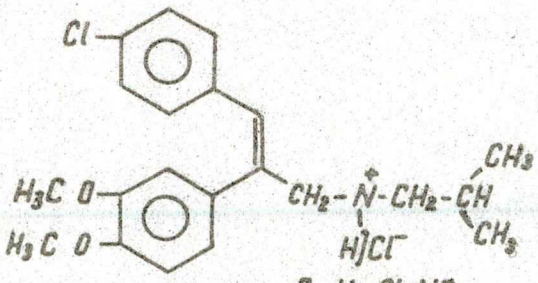
ms: 348,32
op: 187 °C



$C_{20}H_{23}ClN_2O_2$

108

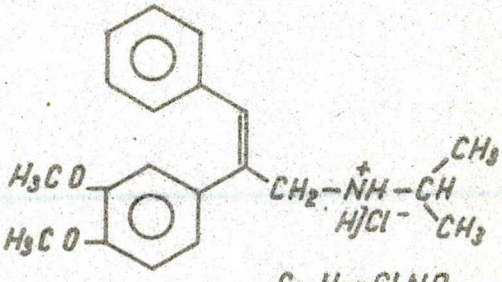
ms: 358,87
op: 182 °C



$C_{21}H_{27}Cl_2NO_2$

ms: 396,36

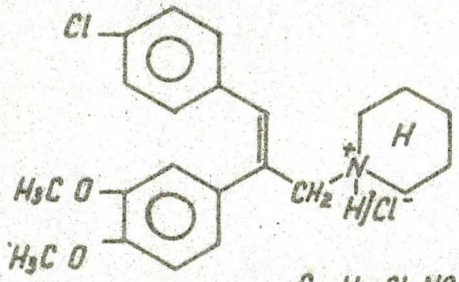
109



$C_{21}H_{28}ClNO_2$

ms: 361,92

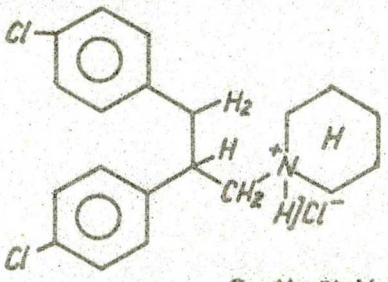
110



$C_{22}H_{27}Cl_2NO_2$

ms: 458,38

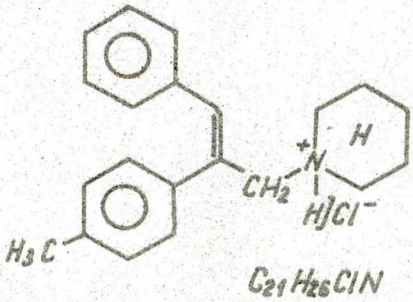
111



$C_{20}H_{25}Cl_3N$

ms: 385,88

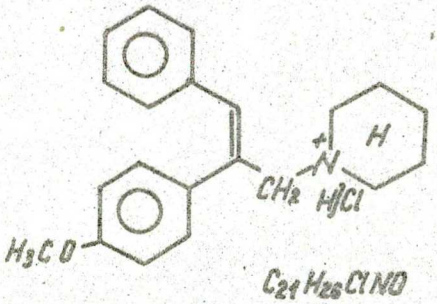
112



$C_{21}H_{26}ClN$

ms: 327,90

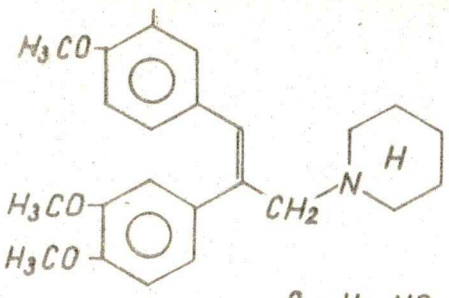
113



$C_{21}H_{26}ClNO$

ms: 343,92

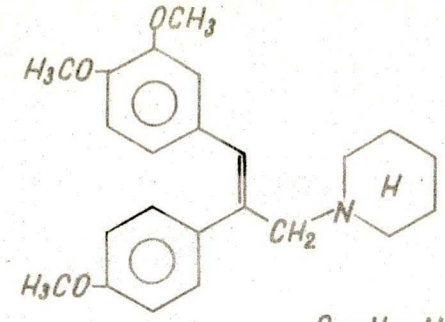
114



$C_{24}H_{31}NO_4$

ms: 397,26

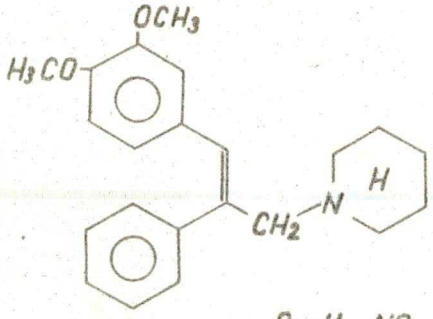
115



$C_{23}H_{29}NO_3$

ms: 367,44

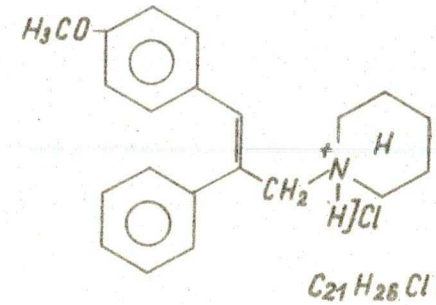
116



$C_{22}H_{27}NO_2$

ms: 337,45

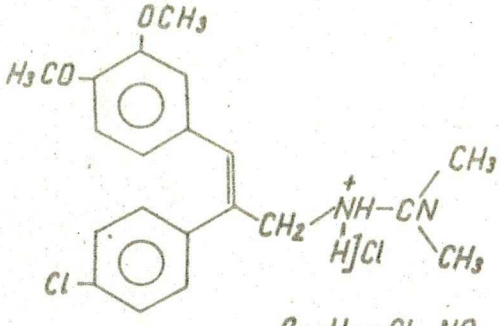
117



$C_{21}H_{28}ClNO$

ms: 343,90

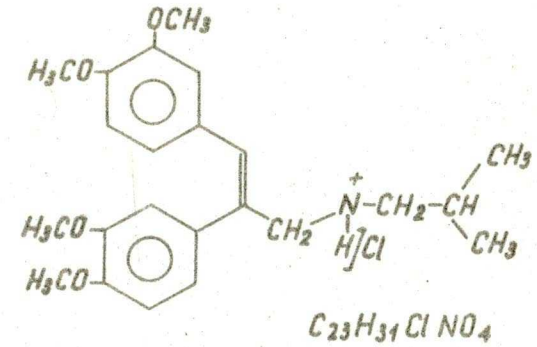
118



$C_{21}H_{27}Cl_2NO_2$

ms: 396,15

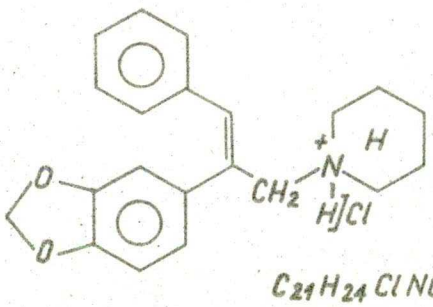
119



$C_{23}H_{31}ClNO_4$

ms: 421,97

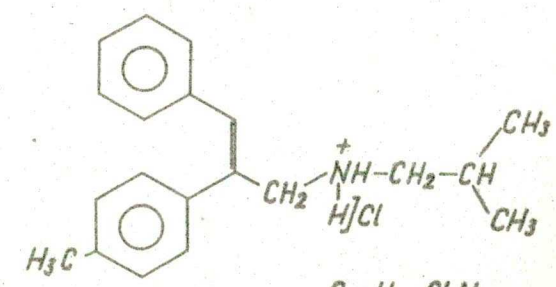
120



$C_{21}H_{24}ClNO_2$

ms: 357,89

121

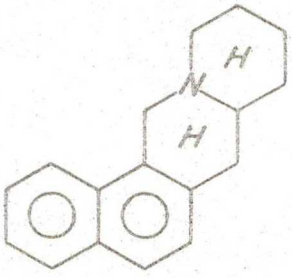


$C_{20}H_{26}ClN$

ms: 343,90

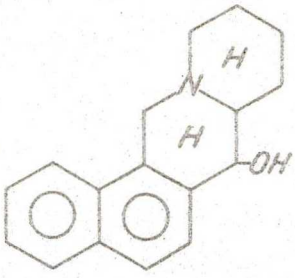
122

Egyéb származékok



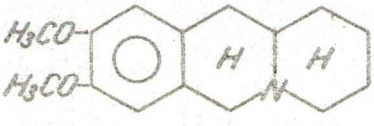
123

$C_{17}H_{19}N$
ms: 237, 347
op: 86 – 87,5°



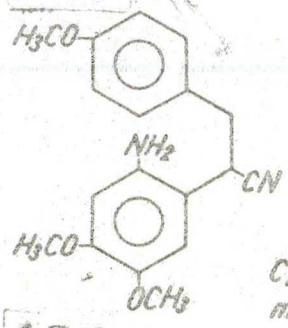
124

$C_{17}H_{19}NO$
ms: 253, 347
op: 160 – 161°



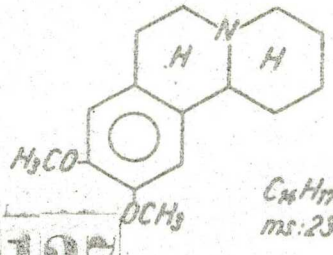
125

$C_{15}H_{21}NO_2$
ms: 247, 141
op: 103 – 104°



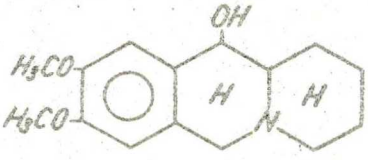
126

$C_{18}H_{18}N_2O_2$
ms: 310, 288



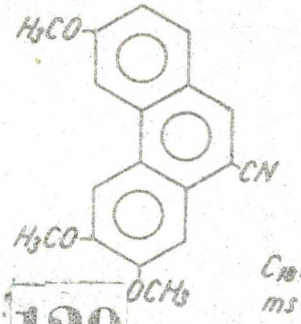
127

$C_{16}H_{17}NO_2$
ms: 231, 297



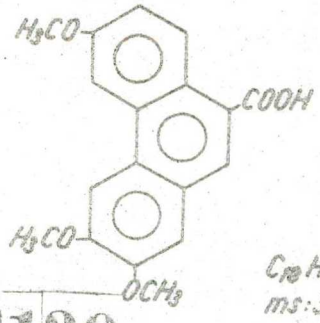
128

$C_{15}H_{20}NO_3$
ms: 262, 310



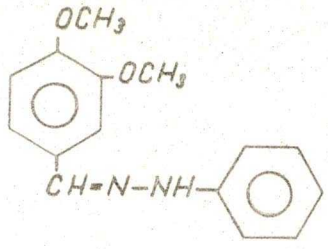
129

$C_{16}H_{15}NO_3$
ms: 293, 272

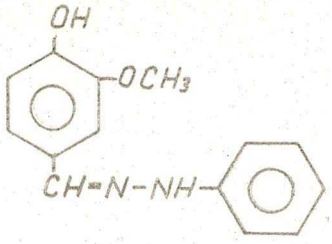


130

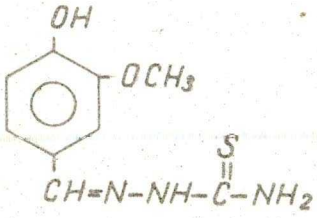
$C_{16}H_{15}O_5$
ms: 311, 264



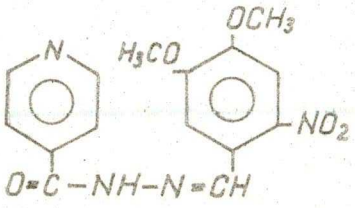
131 $C_{15}H_{16}N_2O_2$
ms: 256,30



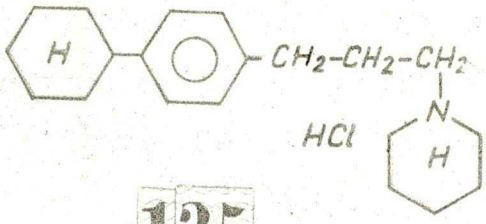
132 $C_{14}H_{14}N_2O_2$
ms: 242,28



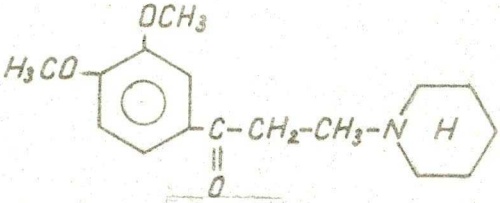
133 $C_9H_{11}N_3O_2S$
ms: 227,23



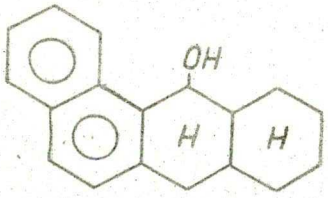
134 $C_{75}H_{14}N_4O_5$
ms: 330,20



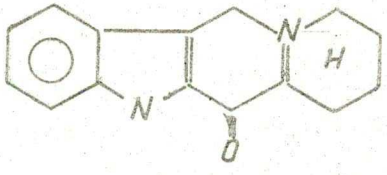
135 $C_{20}H_{31}NCl$
ms: 320,16



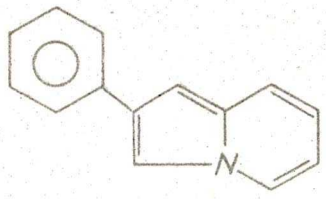
136 $C_{16}H_{17}NO_3$
ms: 271,31



137 $C_{17}H_{21}NO$
ms: 255,31



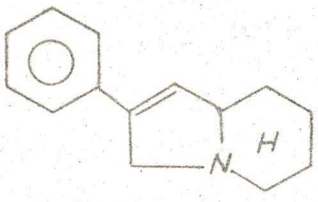
138 $C_{15}H_{14}N_2O$
ms: 223,71



$C_{14}H_{11}N$

ms: 193,25

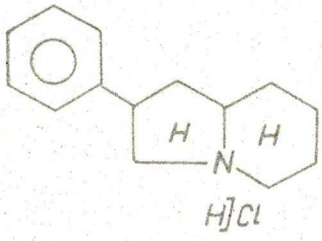
139



$C_{14}H_{17}N$

ms: 199,31

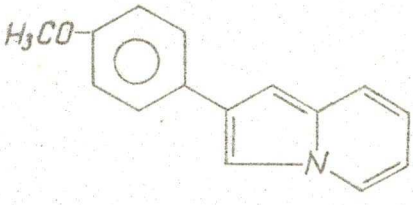
140



$C_{14}H_{20}NCl$

ms: 237,77

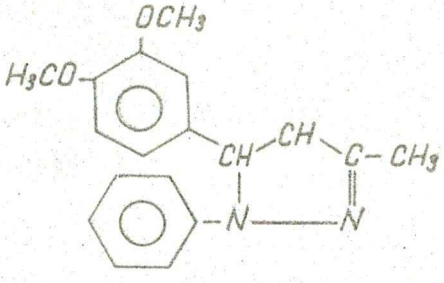
141



$C_{16}H_{14}NO$

ms: 224,25

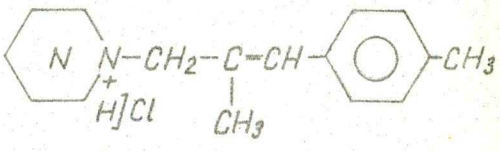
142



$C_{18}H_{19}N_2O_2$

ms: 300,42

143



$C_{16}H_{24}NCl$

ms: 265,37

144

Változtattunk az ötödik gyürü C atomjainak számán: 5-ről 6 C atomra, igy a cryptopleurin származékokhoz jutottunk. Megváltoztattuk a fenantrén részen a metoxi csoportok számát és helyzetét, és más szintén elektronküldő szubsztituensekre cseréltük ki azokat. Igy került a metoxi csoportok helyére a molekulába Cl, CH_3, stb. A 14-es C atomra a H helyébe OH, O, CH_3, Cl, OCH_3 és -N-NH_2 gyököket vittünk be, melyek elektronküldő és vonzó szubsztituensek, igy ennek megfelelően változtatják a N bázicitását. A következőkben a fenantrén részt változatlanul hagytuk, és a kinolizidin vázat változtattuk meg, különböző alifás és ciklusos aminokat épitve a molekulába. Ciklusos aminként morfolint,piperidint és pirolidint, mig nyilt szénláncuak esetében i-propil, n-butil, i-butil, tercier butilamint használtunk.

Ezt követően az előbb felsorolt alifás és ciklusos aminokkal szubsztituált fenantrénre elektronküldő csoportokat /metoxi, klór, metil/ épitettünk be, mely az aktivitásban is megmutatkozott.

A továbbiakban a fenantrén vázon eszközöltünk módositást, szeko-fenantrén származékokat kapva.

A kisérlet sorozat további lépéseként a N-t mint biztos aktiv centrumot cseréltük fel O-ra, S-re, C-re, és igy teljesen inaktiv vegyületekhez jutottunk, amelyek az aktivitás bizonyitásához elengedhetetlenül szükségesek voltak. Utolsó átalakitásként mind a fenantrén vázat, mind a kinolizidin részt módositottuk. Ezeket a vegyületeket egyéb kategóriába soroltam.

Ezek figyelembe vételével az aktivitás szempontjából következő főbb tipusu vegyületeket vizsgáltuk meg, melyeket a vázszerkezet alapján a következőképpen csoportosithatunk:

- Fenantro indolizin /tylophorin/ alkaloidok, melyekből 4 származék állt rendelkezésünkre: tylophorin, demetoxitylophorin, /C_1/ származék, tylophorinin és a 14-oxo-fenantro-indolizin
- Fenantrokinolizidin /kriptopleurin/ származékok, melyekből 44-et vizsgáltunk meg aktivitás és szerkezet közötti összefüggés megállapitására.
- Fenantro ciklusos aminok /piperidin, pirollidin, morfolin/, melyekből 32 vegyületet állitottak elő
- Fenantro alifás aminok /izopropil, izobutil, amin, melyekből 2o vegyületet vizsgáltunk meg,
- Szekofenantrén származékok /alifás és ciklusos aminok/, 24 vegyületet készitettek és vizsgáltuk meg az aktivitását.
- Olyan származékok, melyekben a nitrogént S, O, C helyettesitette,
- Egyéb származékok.

A származékok aktivitásának vizsgálatához az alábbi mikroorganizmusokkal dolgoztunk:

Escherichia coli K_{12} EMI Szeged
Serratia marcescens
Staphylococcus aureus ATCC 6538
Sarcina lutea ATCC 9341
Bacillus subtilis ATCC 6633

Bacillus cereus var.mycoides

Saccharomyces cerevisiae

Geotrichum candidun G8

Candida albicans

Candida utilis

Actinomucor repens 382

Aspergillus niger

Mucor racemosus 121

Mucor hiemalis 264

Mucor fragilis 265

Mucor alboater 967

Circinella v. simplex 648

Rhizopus arrhisus 1/126

Pestalozzia sp.

Penecillium chrysogenum Stamm A 15

Penicillium palladium 899

Penicillium expansum

Penicillium cyclopium 877

Penicillium frequentans OKI

Penicillium luteum

Penicillium biverticulum

Aspergillus oryzae 1/126

Aspergillus glaucus 1o6

Aspergillus versicolor 284

Aspergillus wentii 5o

Aspergillus fumigatus 64/279

Aspergillus niger OKI

Aspergillus proliferans 1o6

Aspergillus japonicus AA

Trichoderma glaucus

Dicoccum sp

Alternaria tenuis 947

Fusarium moniliforme Gibb.

Fusarium poe. 922

Actinomucor repens 382

Trichophyton mentagrophytes 114

Microsporon cookei 64/236

Microsporon fulvum OKI

Absidia orchidis

Mortierella pusilla

Scopulariopsis brevicaulis 9

Schizosaccharomyces octosporus

Saccharomyces chevalieri

Saccharomyces heterogenicus

Saccharomyces carlsbergensis

Saccharomyces ludwigii

Saccharomyces pasteurianus OKI

Saccharomyces cerevisiae USA

Endomycoopsis wickerhamii van der walt

Hansenula anomala

Hansenula subpelliculosa OKI

Dekkeromyces fragilis

Nematospora gossipy G.

Geotrichum linkii 7/132

Geotrichum candidum G. 1.

Geotrichum candidum 9/31

Trichosporon 2o3/3

Procandida tropicalis 64/337

Procandida albicans 7/85

Debaryomyces globosus

Candida solani 6o/468

Candida utilis Vas

Candida requinyii 61/xv

Candida pulcherrima 64/2o OKI

Candida guillermondi 62/117

Candida guillermondi 62/151 F

Torulopsis capensis van der walt

Kloeckera apiculata 67/392

Nigrococcus nigricans

Rhodotorula rubra CBS

Rhodotorula mucilaginosa

Zygosaccharomyces cavarae-benuveri B. Pék

Bacillus thermophilus IP 5123

Bacillus coagulans IP 5264

Bacillus mesentericus 271

Bacillus circulans IP 5121

Bacillus brevis IP 5286

Bacillus macerans IP 5123

Bacillus polymyxa IP 5278

Escherichia coli K 12

Proteus vulgaris

Salmonella typhi watson

A kisérlet kivitelezése a következőképpen történt: A forró, dekantált táptalaj 5o ml-ébe 0,5 ml dimetilszulfoxidban oldott hatóanyagot vittem be. A 0,5 ml DMSO-ban a hatóanyag mg-ban kifejezett molekulasulyának századrésze volt jelen. Igy a DMSO még a legnagyobb koncentrációban sem zavarta a kisérletek értékét. ~~lenetősen~~. Több vegyületnél tapasztaltam kisebb-nagyobb kicsapódást, amit minden esetben feljegyeztem.

A vegyület homogén eloszlása után sterilezett Petricsészébe öntöttem ki 25 ml-t, majd ujból 5o ml-re egészitettem ki, ilymódon felező higitási sort kaptam.

Az igy elkészitett táptalaj felületére az előbb felsorolt organizmusok sürü szuszpenziójából sterilezett ecsettel 7 mm átmérőjü foltokat vittem fel. Az élesztők és baktériumok esetében egy-két napos fiatal kulturákból készitettem lo^5 sejtszámot tartalmazó szuszpenziót. A fonalas gombáknál két-három hetes telepek konidiumait használtam a szuszpenzió készitéséhez.

Mind az organizmusok tenyésztéséhez, mind a biológiai hatás vizsgálatához élesztőkivonatos táptalajt használtam, melyet a következő módon és arányban állitottam össze:

5ooml deszt.vizbe 15 g agart, lo g glükozt,5 g élesztőkivonatot /No L 2o-as/ mértem be, majd 5oo ml 7,4 pH-ju Sörensen féle foszfát /M/15/ puffert adtam hozzá. Az igy kapott táptalajt 2o percig autoklávoztam, majd a lombikok alján lévő csapadékról a táptalaj tisztáját sterilezett edénybe gyüjtöttem, és a kisérletekhez ezt

használtam fel.

30 C°-on 24, illetve 48 órás inkubálás után értékeltem az eredményeket.

3.5. Hatóanyag felvétele és a sejtekből való kilépésének aránya sötétben és fényen

A kisérletet demetoxicriptopleurinnal végeztem el. Ez is, mint a többi tylophorin és criptopleurin származék fény hatására könnyen bomlik, szerkezete átalakul, és aktivitását is elveszti. E kisérlettel arra a kérdésre vártunk választ, hogy a sejtek a vegyülettel 0, 15, 30, és 45 perces kezelésre a hatóanyag hányad részét képesek felvenni, és 60 perces állás után a hatóanyag hányad részét adják le fényen és sötétben, vagyis fényen tartva kivédhető-e a fungicid hatás.

A kisérletekhez Saccharomyces cerevisiae R XII törzsét használtam, melyet élesztőkivonatos táptalajban 15 óráig rázógépen elszaporitottam. Az élesztőkivonatos tápoldat összetétele:

100 ml deszt.viz
0,5 g glükoz
0,5 g élesztőkivonat

Az igy összeállitott tápoldatból 40 ml-t mértem be 250 ml-es gömblombikba. A tápoldatot sterileztem, és kihülés után leoltottam az élesztőtörzzsel. 25 órás rázatás után

igy 3 lombikból ki tudtam mérni az 5 x 1oo mg élesztőt. Egy 1oo mg élesztőt tartalmazó küvetta kontrollként szerepelt, 4 küvettába 1o -1o ml 4 pH-ju foszfát puffert adtam, /továbbiakban csak puffer/ melybe 1oo ug demetoxicriptopleurint mértem be.

A hatóanyaggal a sejtek 0, 15, 3o, 45 percig voltak együtt, majd a sejteket lecentrifugáltam 4ooo fordulat/percen, 1o percig. A kontrollról 3o perc után választottam le a sejteket. A szupernatanst félretettem, a sejteket 2 x 1o ml pufferrel átmostam, és ezek szupernatansát is félretettem méréshez. A mosásra azért volt szükség, hogy az élesztő sejtek felületéhez adszorbeálódott hatóanyagot eltávolitsuk, hogy ne zavarja a mérési eredményeket. Az igy kétszer átmosott sejtekre 2o ml puffert mértem minden időmintára és kontrollra. Ezeket a mintákat megfeleztem, és minden időmintából 1o ml-t 6o percre napfényre tettem, melynek luxban kifejezett fényértéke 3oooo volt, 1o ml-eket pedig 3o C°-os termosztátba raktam szintén 6o percre. A fényre kitett mintákat jéggel hütöttem.

A 6o perces kezelések után centrifugálás következett. A sötétben tartott szuszpenzió lecentrifugált fölüluszójának az extincióját 262 nm-nél Spektromom 2o2-es fotométeren kvarc küvettában mértem a pufferhez viszonyitva. A fényen tartott sejtek fölüluszóját 262 nm-nél és 4o4 nm-nél mértem meg, szintén a foszfát puffert alkalmaztam összehasonlitó oldatnak.

3.6. Fenantrén származékok toxicitásának vizsgálata

A tylophorin származékoknak az évezredek során megvizsgált és megállapitott tényleges hatásáról már az irodalmi áttekintésben bővebben irtam. Mi az ujonnan előállitott származékok toxicitására voltunk elsősorban kiváncsiak, összehasonlitva azokat a növényből izolál és több szerző által leirt vegyületek hatásának toxikusságával.

A következő egyszerü kisérletet állitottuk be, hogy az előbb felvetett kérdésre választ kapjunk. A kisérlethez fehér patkányokat a SZOTE Gyógyszerhatástani Intézetéből kaptunk.

Az állatokat éterrel elaltattam, majd hátukon két db, kb 2-2,5 cm átmérőjü területet 10 %-os Na_2S -dal bedörzsöltem szőrtelenités végett. Néhány perces állás után könnyen el lehetett távolitani a szőrt a kezelt felületről. Csap alatt folyó vizzel erősen átmostam a felületeket, majd a szőrtelenitett területeket 10 %-os ecetsavval közömbösitettem.

Az állatokat 3 napig pihentettem, majd 3 nap után vittem fel a hatóanyagot a szőrtelenitett felületre.

Öt egymást követő reggel 8-9 óra között kezeltem az állatokat a származékokkal, melyet természetesen éterrel való kezelés, altatás előzött meg. A vegyületekből 1,25 M/100 oldatot készitettem, az oldószer DMSO volt. Hagedorn

pipettával 0,05 ml-t vittemfel a szőrtelenitett területre, és azon egyenletesen szétkentem.

A vegyületek által előidézett változást a patkányok bőrén naponta értékeltem a kezelés alatt.

A kisérlet sorozatban a következő vegyületek toxicitását vizsgáltuk meg: /2/, /5/, /9/, /14/, /30/, /38/, /62/, /64/, /68/, /72/.

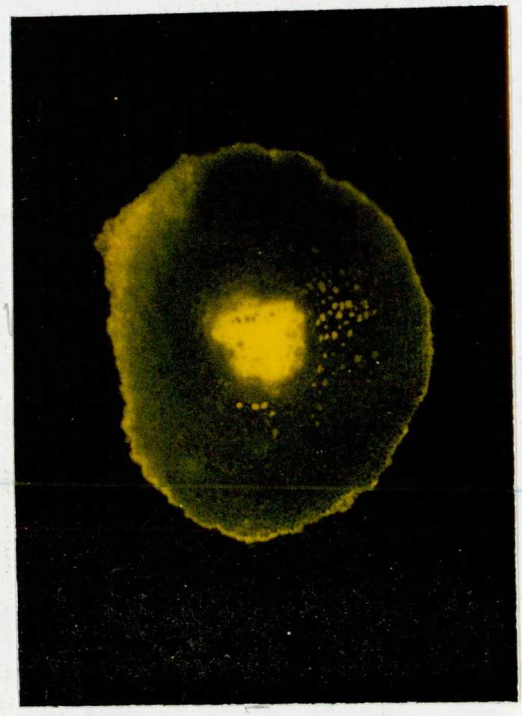
A vegyületek közül /2/ a növényből izolált demetoxitylophorin, az /5/, /6/, /9/, /14/ fenantro-kinolizidin származék, melyek között van kloros, hidroxilos, metoxi csoport nélküli. A /38/-as benzpirén, mely az előző származékokhoz hasonlóan, fehérjeszintézist gátló vegyület. A /62/, /64/, /68/, /72/ fenantrén származékok, a /62/, /64/ fenantro-metil-piperidin, a /68/,/72/ alifás tipusu vegyület.

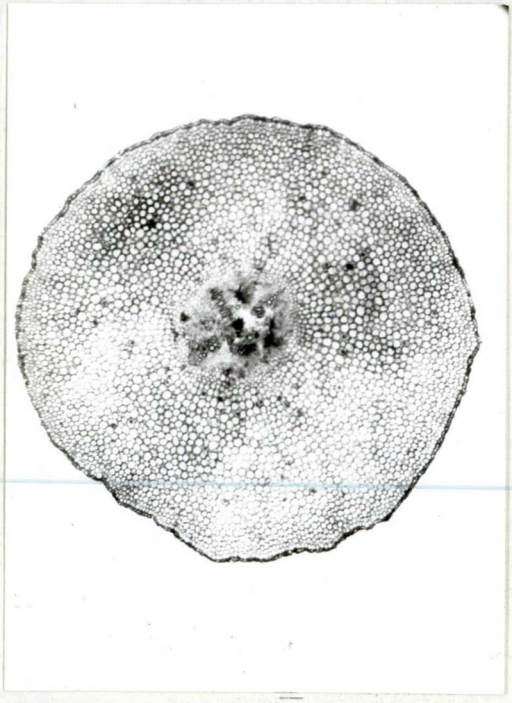
Kontrollként a DMSO 0,05 ml-ét vittem fel és egy felületet kezeletlenül hagytam.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSE

4.1. Az alkaloid lokalizációja Cyn.vincetoxicum szerveiben

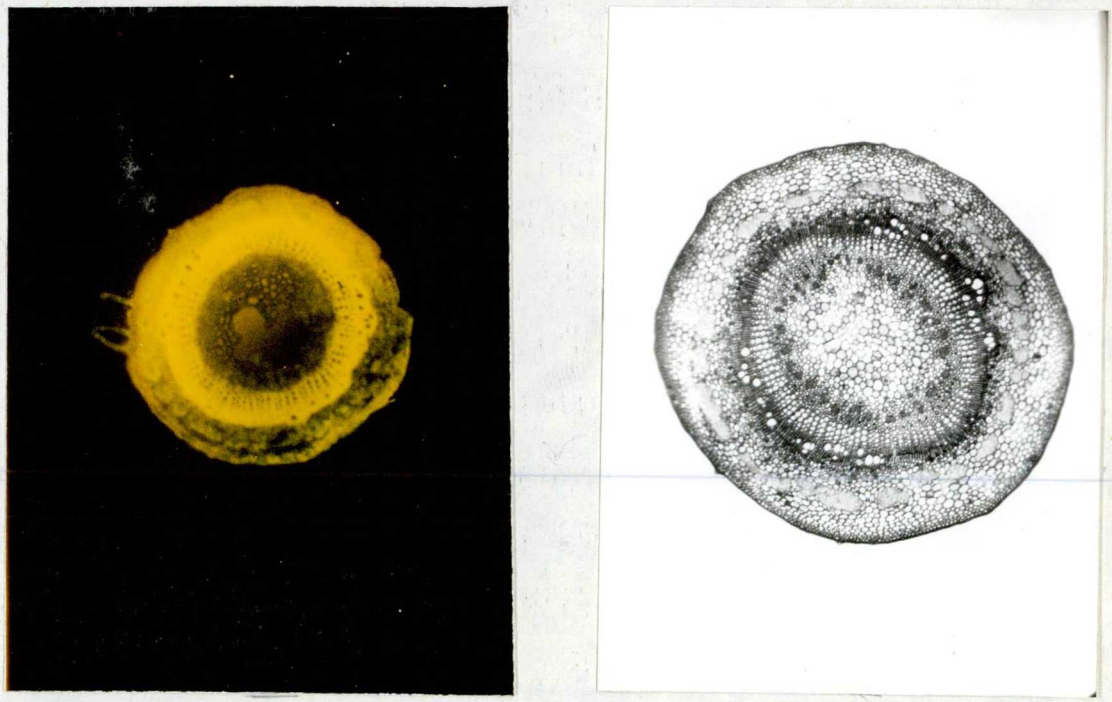
Az"Irodalmi áttekintés" cimü fejezetben részletesen ismertettem több szerző kisérleti eredményeiből levont következtetést az alkaloidok képződéséről, lokalizációjáról, szerepükről a növényben. Az alkaloidok gyakorlatilag minden szövetféleségben megtalálhatók a háncsnyalábok rostacsöveit kivéve. Legjelentősebb előfordulásuk, ahol számottevő mennyiségben vannak jelen az epidermisz, az aktiv szövetek, edénynyalábok, tejcsövek. Ezt figyelembe véve metszeteket készitettem a kisérleti részben leirtak alapján gyökérből, szárból,levélnyélből és kocsányból. A demetoxitylophorin lokalizációját könnyen nyomon követhetjük, mivel a vegyület bontott származéka UV fényben sárga szinben fluoreszkál. Minden növényi részben megtaláltuk az alkaloidot, de más koncentrációban. A különböző szervekből készült fénnyel kezelt metszeteket UV fényben mikroszkoppal megvizsgálva megállapithatjuk, hogy az alkaloida a következőképpen oszlik meg a növényben: Legtöbbet a gyökér tartalmaz, majd csökkenő sorrendben a szár, levélnyél és a kocsány következik. A fényképek alapján, ha elemezzük az alkaloida elhelyezkedését a szövetekben, a következőket állapithatjuk meg:





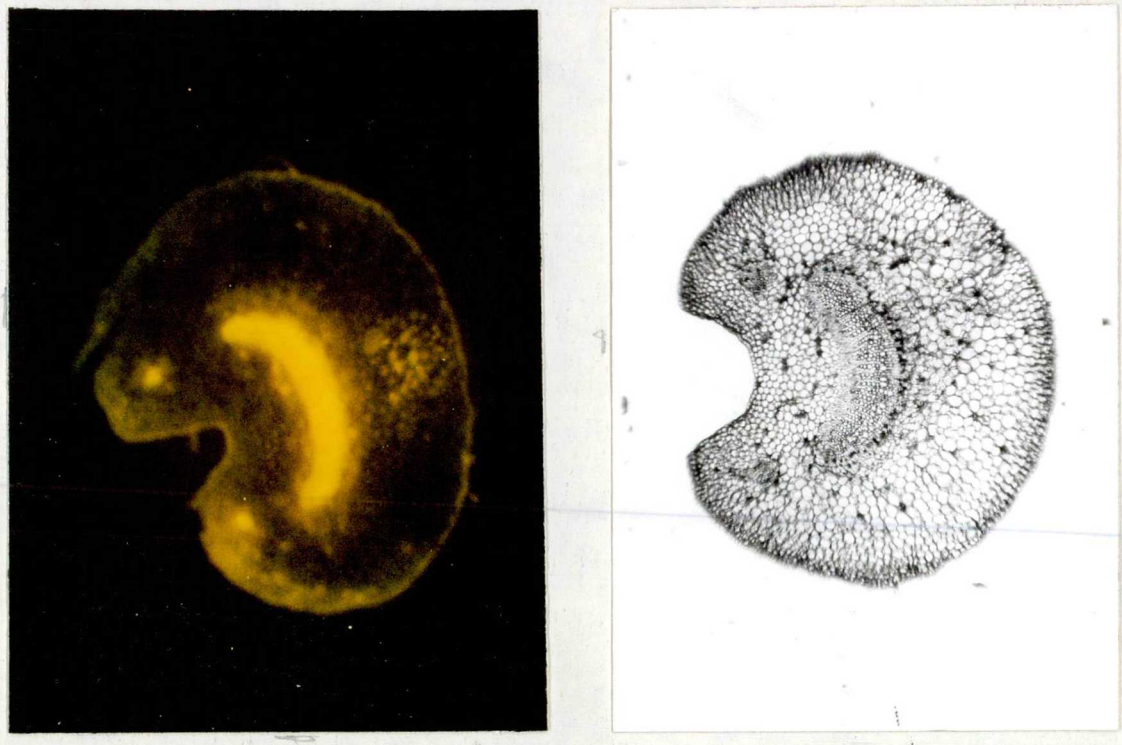
8.ábra.UV és látható fénnyel készült szövettani képek a Cyn.vincetoxicum gyökér keresztmetszetéről

A gyökérről készült felvételen jól látható, hogy az alkaloida jelentős mennyiségben a fanyalábokban halmozódik fel. A tracheák, tracheidák megvastagodott falában, a szállitóedények között elhelyezkedő szklerenchima sejtek falába jelentős mennyiségü demetoxitylophorin épül be. A háncsnyalábok fala nem mutat sárga fényü fluoreszcenciát. A központi henger legkülső sejtsorát képező endodermisz falában is kimutatható az alkaloida. Egyes képeken az elsődleges kéreg egyes sejtjei is hasonló fluoreszcenciát mutatnak. Az epidermisz és az alatta lévő hypodermisz sejtekben szintén jelentős mennyiségü alkaloida raktározódik.



9. ábra. A Cyn.vincetoxicum szár keresztmetszetéről UV és látható fénnyel készült képek

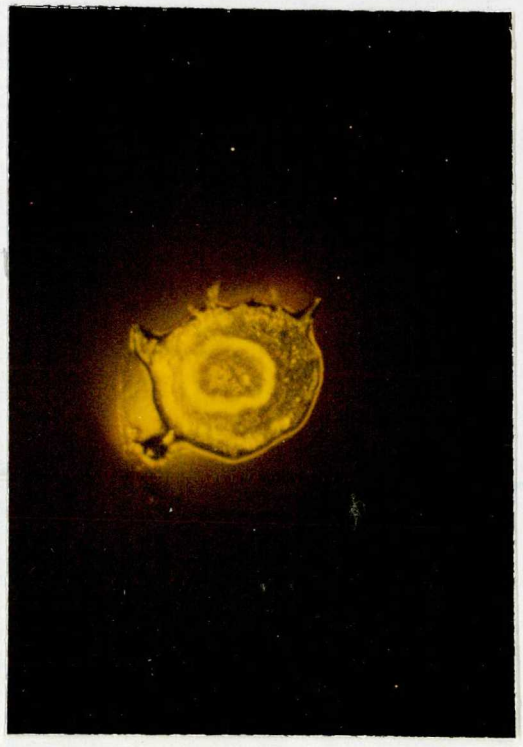
A szár szöveteiben hasonló az alkaloida lokalizációja, mint a gyökérben. A legnagyobb mennyiségben itt is a fanyalábot alkotó sejtek falába inkrusztálódik a vegyület. A nyalábon belül a kambiumhoz közel levő sejtek nagyobb intenzitással fluoreszkálnak, mint a kambiumtól távolabb lévők. Az epidermisz sejtekben az epidermiszhez kapcsolódó, a védelem szolgálatában levő szőrökben, a hypodermiszben, és az alatta elhelyezkedő szklerenchima elemekből felépülő csoportokban jól látható az alkaloida jelenléte.

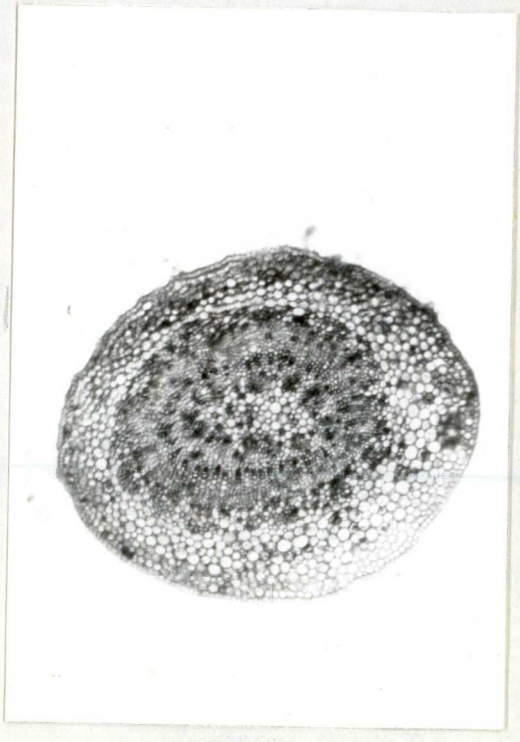


lo. ábra. UV és látható fénnyel készült szövettani képek a Cyn.vincetoxicum levélnyél keresztmetszetéről

A képen látható a levélnyél szöveti szerkezete, melyről egyértelmüen leolvasható, hogy a demetoxitylophorin -az előzőekhez hasonlóan- a fanyalábokban, és a bőrszövet rendszer egyes sejtjeinek falában rakódik le jelentősebb mennyiségben. A kifli alakban görbült nyaláb két végén található külön álló fa elemekben jelentős mennyiségü alkaloida lokalizálódik.

A generativ szervekben is ugyanazokban a szövetféleségekben lokalizálódik a demetoxitylophorin, mint a vegetativ szervekben.





11.ábra. A Cyn.vincetoxicum kocsányáról készült keresztmetszetek UV és látható fénnyel készült képei

Itt is a fanyalábok tartalmazzák a legtöbb alkaloidot, majd ezt követi a bőrszövet rendszer egyes sejtjeiben felhalmozódó demetoxitylophorin mennyisége.

Messzemenő következtetéseket ezekből a kisérletekből nem lehet levonni. Azt azonban egyértelmüen megállapitottuk, hogy az alkaloida mind a gyökérben, mind a hajtásban a legnagyobb mennyiségben a fanyalábok sejtjeinek falában lokalizálódik, kisebb mennyiségben található a bőrszövet rendszerben, és csak elvétve fordul elő a szerveket alkotó más tipusu sejtekben.

4.2. A demetoxitylophorin előállitása Cynanchum vincetoxicumból

A Cyn.vincetoxicumban található alkaloida extrahálását már Dioscorides is leirja. E primitiv módszer lényege, hogy a növényt borban kell megfőzni. Ez gyakorlatilag nem más, mint egy savas-etanolos extrahálás. A középkorban iródott füvészkönyvek -Dioscoridestől átvéve- mind hasonló módszert javasolnak.

A tylophorin és cryptopleurin származékok kristályos alakban való előállitásával az elmult 5o évben igen sok kutató foglalkozott. Lásd "Az Asclepiadaceae család fontosabb alkaloidjai" c.fejezetet. Az általuk közölt előállitási metódusok a következő csoportokra oszthatók:

- savas extrahálást alkalmaztak
- szerves oldószerrel vonták ki a vegyületet
- a kettőt együtt alkalmazták

Az extraktumból a tisztitást vagy rázótölcsérben történő kirázással oldották meg, vagy oszlopkromatográfiás módszert alkalmaztak.

Számos módszert próbáltunk ki mi is, mig végülis az "Anyagok és módszerek" fejezetben leirtakat találtuk a legmegfelelőbbnek. A módszer nagy előnye, hogy a sürítményből nagy mennyiségü demetoxitylophorin kristály válik ki, mely egyszerü szüréssel kinyerhető.

A munka során kétszeri extrahálásra azért volt szükség, mert az első savas-propanolos extrahálás után még

tekintélyes mennyiségü vegyület maradt a gyökérben. A tisztán savas extrakciót a költségek csökkentése miatt állitottuk be.

A széntetrakloridos és a deszt.vizes kirázásoknál lugositásra azért volt szükség, mert az alkaloida igy gyakorlatilag teljes mennyiségben a szerves fázisba megy át. Az alkalmazott 9-es pH-n a vegyület ugyanis disszociálatlan alakban van jelen, és igy az a szerves oldószerben jobban oldódik.

A lugos deszt.vizes kirázást azért iktattuk közbe, mert igy az izopropanol egy részétől a vizben oldódó más - a kristályosodást gátló - anyagoktól mentesiteni tudtuk a besüritésre váró oldatunkat. Ezért válhatott ki jelentős mennyiségü kristály a süritményből.

A maradékot preparativ rétegen futtattuk. A preparativ réteget azért alkalmaztuk, mert Ferenczy a Solanumokból kinyert alkaloidoknál nagyon előnyös gyors módszernek találta, amit ezek a kisérletek is bizonyitottak. A preparativ rétegen aránylag nagy mennyiségü anyagot lehet gyorsan, jól és olcsón elválasztani. A gyorsaságát annak köszönheti, hogy a kromatogram rövid idő alatt kifejleszthető és a keresett anyag azonnal és könnyen lekaparható a lemezről. Az olcsósága abból adódik, hogy aránylag kevés anyagot kell futtatószerként alkalmazni, jóval kevesebbet, mint az oszlopkromatográfiánál. A jól kivitelezett preparativ rétegen nagyon szépen el lehet különiteni az egyes anyagokat.

A futtatásnál azért alkalmaztuk először a savas futtatót, mert ebben a demetoxitylophorin a startban marad. A szennyeződések jelentős hányada viszont felfut. A második benzol:etanolos futtatóban igen jól szétválik a vegyület többi nem kívánatos szennyeződéstől. Az Rf értéke 0,54.

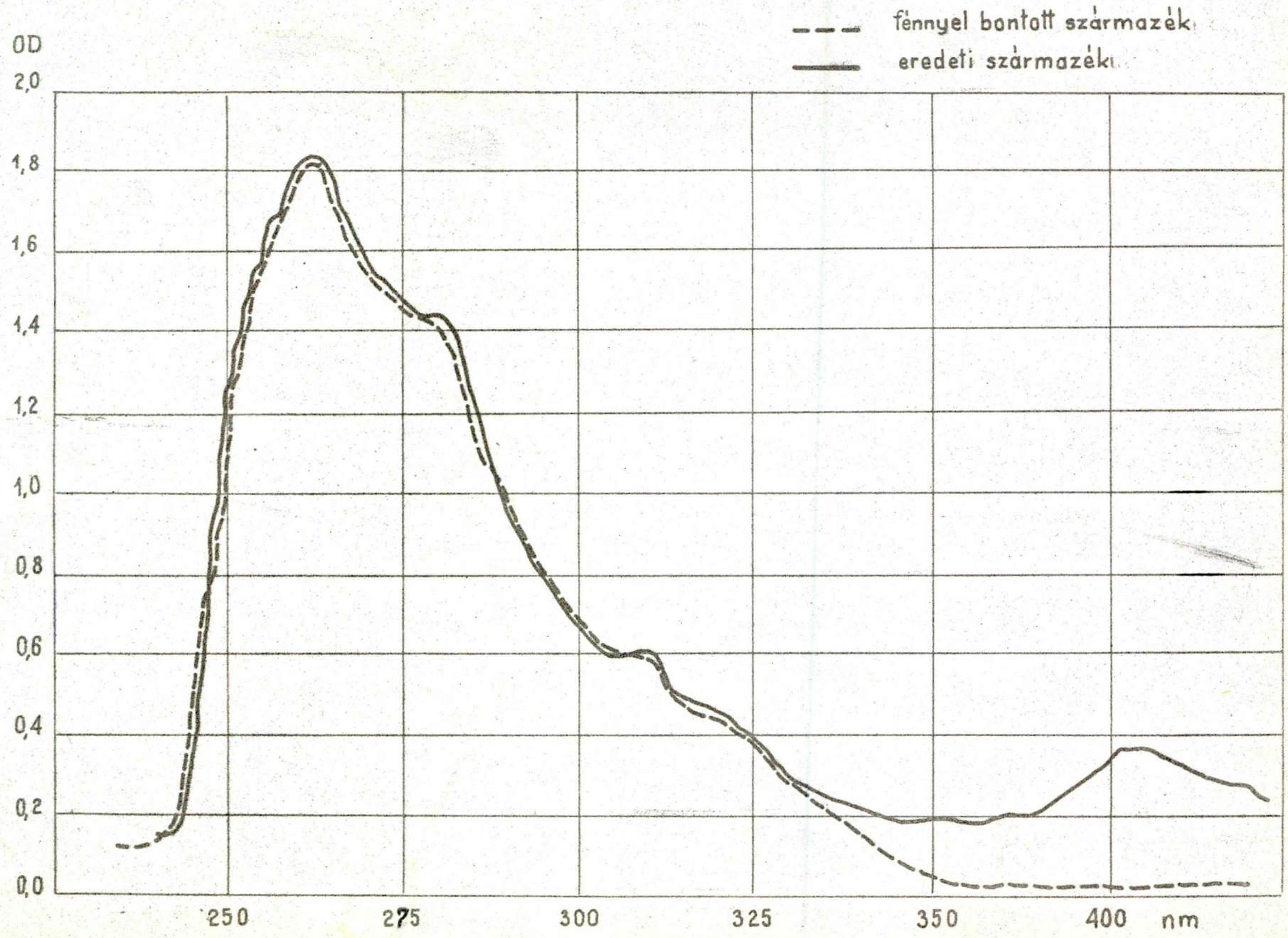
6 kg szárez gyökérből 150 mg tisztitott, kristályos vegyületet nyertünk.

4.3. A demetoxitylophorin bontása különböző oldószerben, a bontott termék előállitása és aktivitásának meghatározása

A következőkben ismertetésre kerülő kisérletekre azért volt szükség, hogy a demetoxitylophorinról minél több információt szerezzünk. Feleletet vártunk azokra a kérdésekre, hogy a különböző pH-ju közegekben és különböző oldószerekben milyen intenzitásu és mértékü a bomlás sebessége.

4.3.1. Elnyelési maximum meghatározása

A fény hatására bekövetkező változások regisztrálásához első lépésként a vegyület elnyelési maximumát kellett meghatározni az UV és látható tartományban.



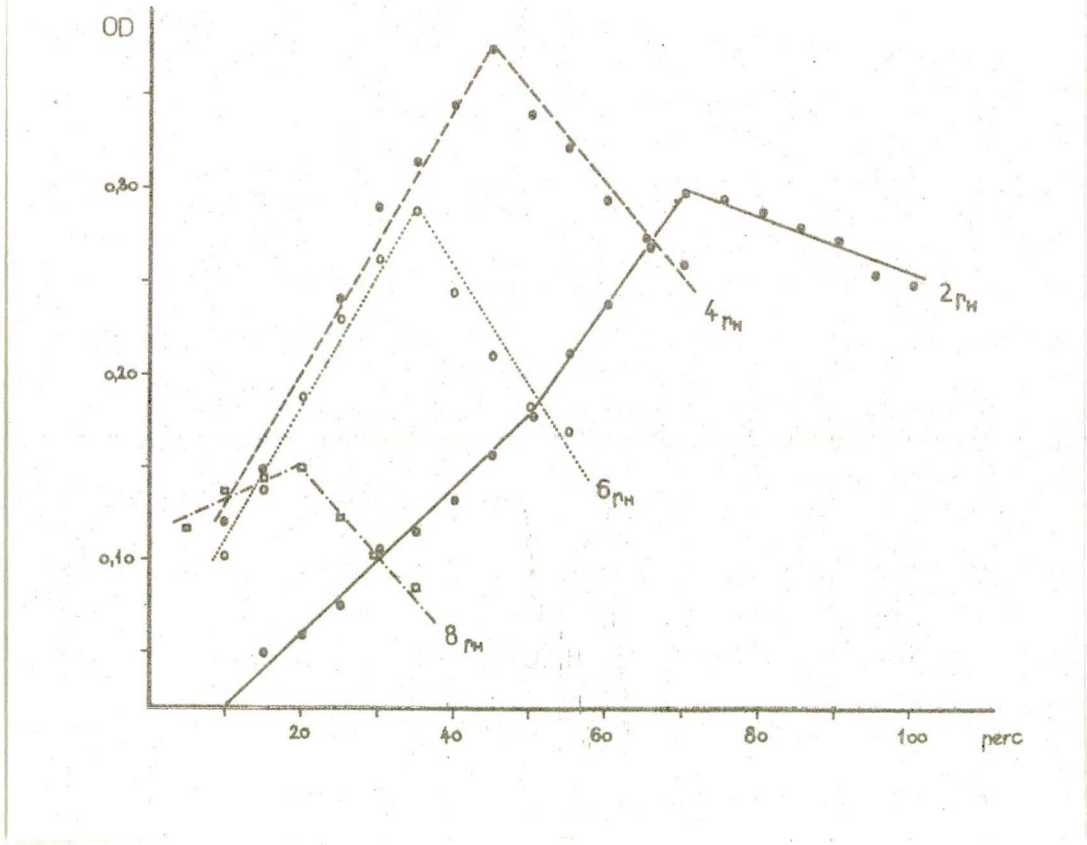
12. ábra A demetoxitylophorin abszorbciós spectruma

A 12. ábráról egyértelmüen leolvasható, hogy a bontatlan terméknek csak egy elnyelési maximuma van, 26o - 265 nm között. Mi 262 nm-en dolgoztunk. Irodalmi adatok alapján is ez az érték a fenantrén váz elnyelési maximuma.

A bontott terméknek két maximuma van, az egyik megegyezik a bontatlan termékkel, hiszen a fenantrén részen a fény hatására változás nem történik, a másik maximumot 4o4 nm-nél kaptam. Ez az érték a fény hatására aromatizálódó indolizidin váz elnyelési maximuma. Később cryptopleurinnal és demetoxicrytopleurinnal is elvégeztem a bontást és mérést, ugyanezt az eredményt kaptam. Az aromatizálódott kinolizidin váz elnyelési maximuma is ugyanezen hullámhosszon van.

4.3.2. Demetoxitylophorin bontása 2,4,6,8-as pH-ju pufferben

A 13. ábráról leolvasható, hogy lugos közegben sokkal gyorsabb a bomlás, mivel a vegyület disszociációja vissza van szoritva. Fény hatására a telitett gyürü aromatizálódik, hidrogént veszit, és ami ezzel jár, szinesedik is. Különböző pH-n, különböző idő mulva élénk sárga szinüvé válik az oldat, majd ujra szintelenedni kezd, aminek az az oka, hogy felszakad a molekula.



13.ábra. Demetoxitylophorin bontása fényen különböző pH-ju foszfát pufferben

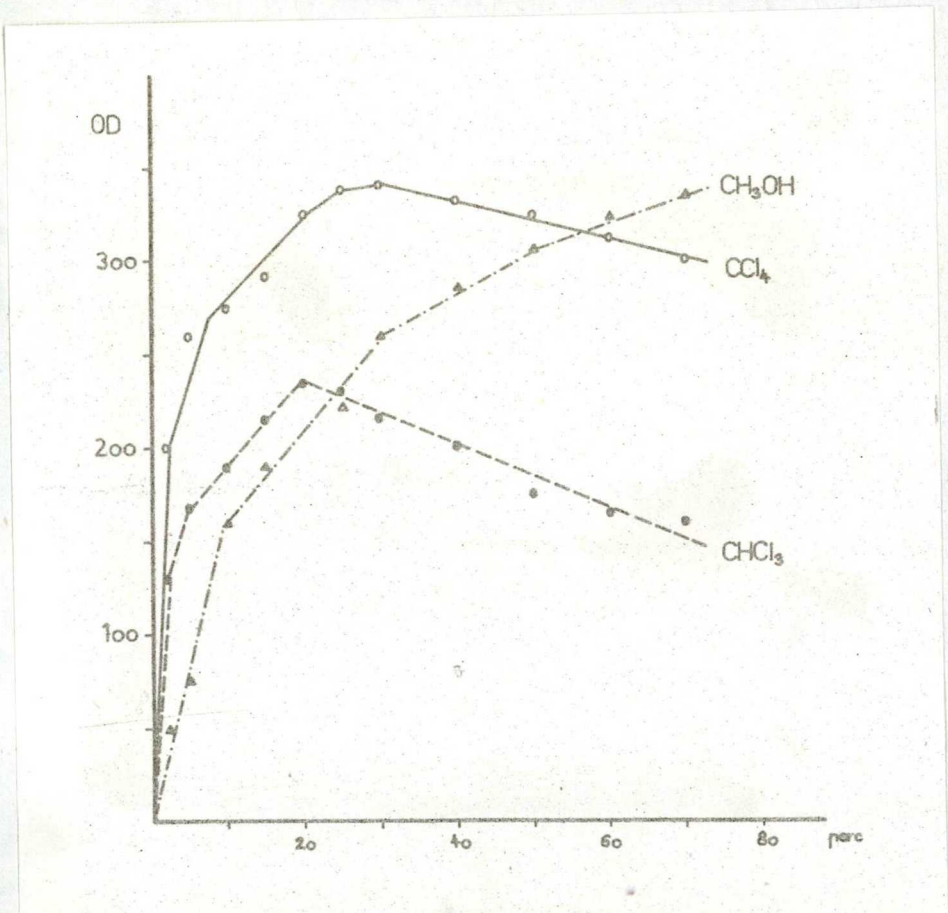
46ooo luxon 8-as pH-n ez már 23 perc alatt bekövetkezik, mig 2-es pH-n 7o percre van szükség, hogy a vegyület az első bontott állapotba kerüljön. Lugos pH-n nemcsak hamarabb éri el a maximumot, de a maximum extinciós értéke is kisebb. E jelenségnek az az oka, hogy lugos közegben nemcsak az aromatizálódás történik gyorsabban, hanem a vegyület felszakadása is. Ezért nem ér el akkora maximumot.

Bontott termék előállitására legkedvezőbb a 4-es pH,

és a 45 perces megvilágitás. Mivel ilyen paraméterek mellett a vegyület nagy része a bontás első stádiumában van.

4.3.3. Demetoxitylophorin bontása széntetrakloridban, kloroformban, metanolban

Összehasonlitó vizsgálatot végeztünk különböző oldószerekben a bontott termék előállitására. E kisérlettel elsősorban arra a kérdésre vártunk feleletet, hogy melyik az a szerves oldószer, amelyikben a bontott termék nem oldódik, tehát egyszerü szürési metódussal előállitható.



14.ábra.Demetoxitylpphorin bontása fényen különböző szerves oldószerben

Mint a 14.ábrán látható, a vegyület kloroformban 2o perc alatt, széntetrakloridban 3o perc alatt bomlik el, mig metanolban 7o perc sem elegendő, hogy a vegyület aromatizált állapotba kerüljön.

Ennél a kisérletnél egy érdekes -a bontott termék előállitásához jól felhasználható - jelenséget figyeltünk meg. A bontott termék széntetrakloridban nem oldódik, pelyhes csapadék formájában kicsapódik, tehát a széntetraklorid az optimális közeg a bontott termék előállitásához.

4.3.4. Demetoxitylophorin bontása különböző hullámhosszuságu fényen

Tudtuk, hogy a bontatlan demetoxitylophorin elnyelési maximuma 262 nm-nél van, a nagyobb hullámhosszu tartományban nincsen csucs. A szinszürős kisérlettel választ kerestünk arra, hogy az UV tartományba eső energián kivül a spektrum más tartományába eső energia képes-e elbontani a vegyületet.

A szinszürő száma	Átengedett fény hullámhossza	A folt szine előhivás után
UG 1/1,5	3o2-4o5	élénk sárga
GG 13/2	39o-	"
GG 11/2	42o-1o5o	szintelen

VG 4/2	436-	szintelen
BG 12/2	32o-5o9	élénk sárga
OG 2/2	54o-	szintelen
RG 2/4	578-	"
fekete papir		"
tárgylemez		élénk sárga
letakaratlan kontroll		"

Értékelve a fenti adatokat a következő összefüggéseket, tényeket állapithatjuk meg. A GG 11/2-es szürő, mely 42o-1o5o nm-ig minden hullámhosszuságu fényt átenged, megakadályozza a vegyület bomlását éppen ugy, mintha fekete papirral volna letakarva, tehát a látható tartományba eső energia nem felelős a bontásért. Az UG 1/1,5-es szürő, mely 3o2-4o5 nm-ig engedi át a fényt, olyan bontást eredményez, mint a letakaratlan kontroll. Sőt a GG 13/2 szürő, mely 39o nm-től a 7oo nm-ig minden hullámhosszu fényt átenged, hasonló elváltozást eredményez. Mivel a 42o nm-es fény már inaktiv az indolizidin és kinolizidin származékok bontását illetően, egyértelmüen megállapitható, hogy a hosszu UV sugarak felelősek a vegyületek bontásáért. Ez a kisérlet adódik feleletet arra a kérdésre, hogy a növényben a fénynek kitett hajtásokban miért nem bomlik el a vegyület. Nézetünk szerint azért, mert az UV tartományba eső fény nem jut el a belső szövetekbe. A vegyület nagy része pedig, mint azt a lokalizációs kisérletek is igazolták, a szállitó nyalábokban akkumulálódik.

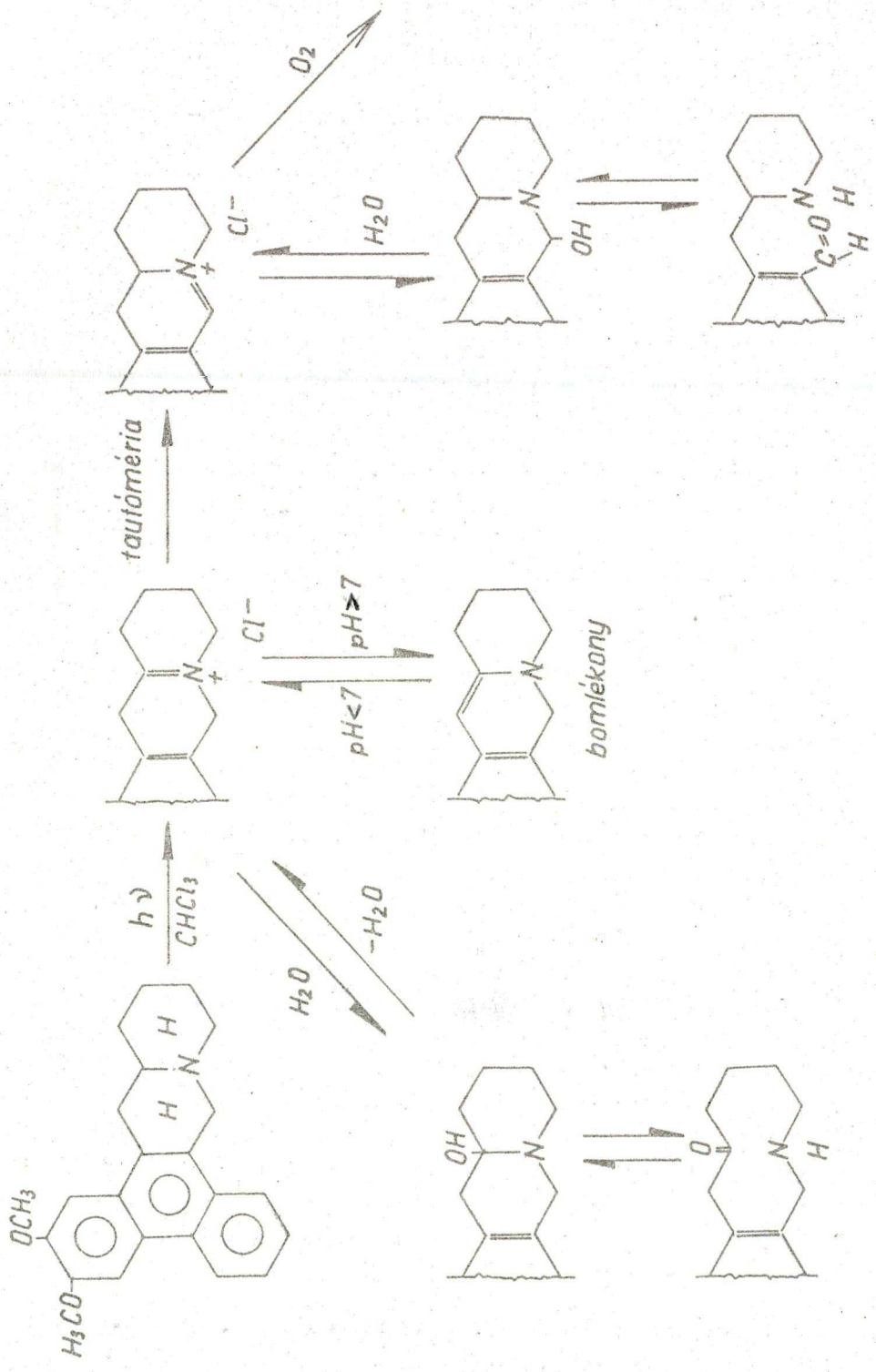
A cryptopleurinnak fény hatására bekövetkező bomlá-

sával Gellert és mts foglalkoztak. Feltételezték, hogy a sárga szín a cryptopleurin tetrahidro származékától ered.

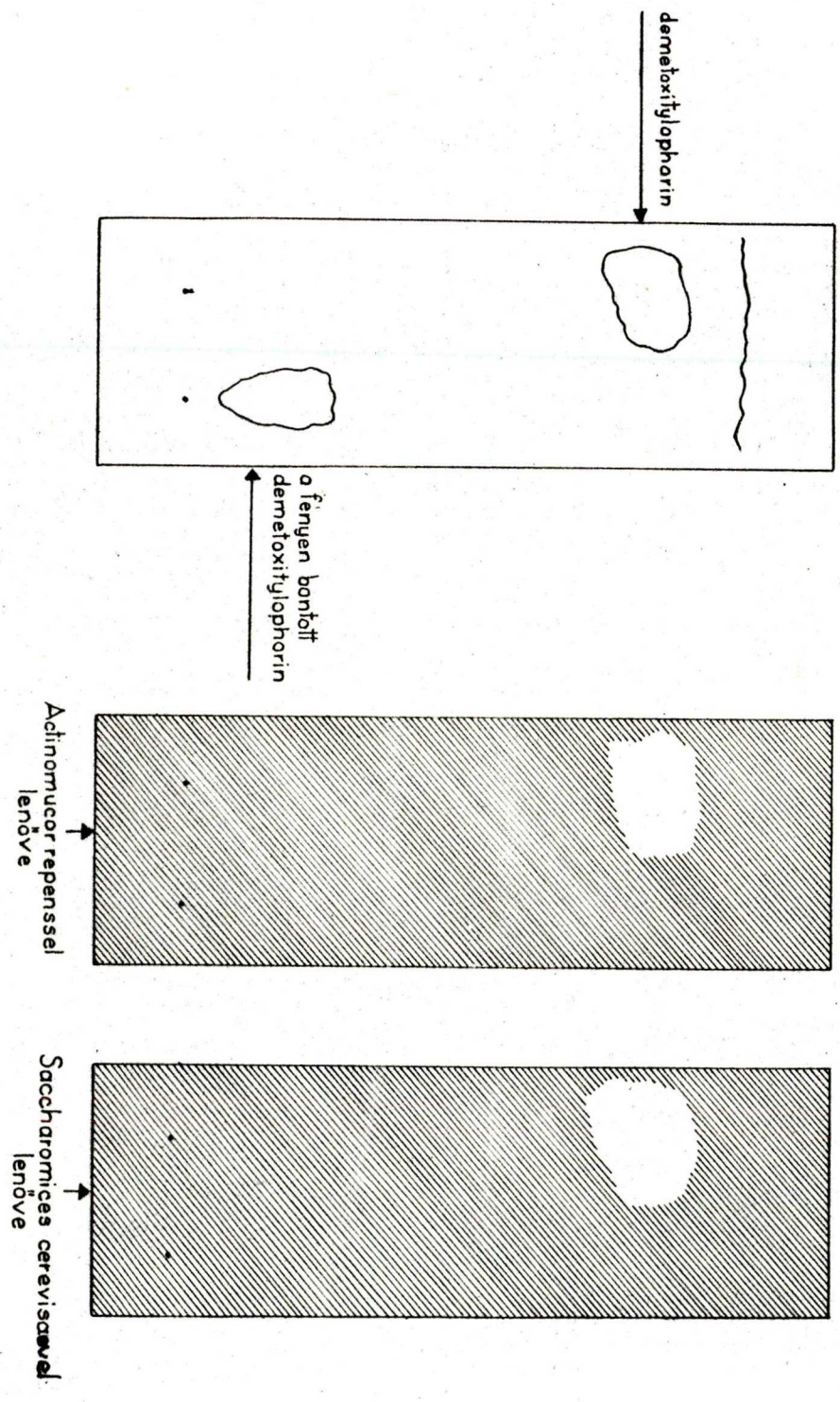
Háznagy és mts /1967/ a demetoxitylophorin bomlásának IR spektrumából azt a következtetést vonták le, hogy az alkaloidából UV sugárzás hatására szekundér-amin származék keletkezik.

Földeák és mts /1974/ is behatóan foglalkoztak ezzel a témával. Szerintük a vegyület a következő bomláson megy keresztül. / lásd 15.ábra./

A 15. ábrán látható vegyületek egy részét sikerült tisztán kinyerniük. A kloroformos közegben fény hatására bekövetkező bomlás első lépéseként a nitrogén quaternerezódik, mely szobahőmérsékleten percek alatt bekövetkezik. A quaternerezódött termékből három irányba történhet részben reverzibilis reakció. Az ábra jobb oldalán látható reakciósor jól mutatja, hogy oxidativ körülmények közt a gyürüszakadás elkerülhetetlen. A középső reakciósor igazolja a 4. 3. 2. fejezetben leirtakat, történetesen azt, hogy lugos közegben a bomlás sokkal intenzivebb.



15.ábra. Demetoxicryptopleurin bomlása cloroformban fény hatására Földeák szerint



16.ábra. A fényen bontott termék inaktiv a két mikroorganizmussal szemben

4.3.5. Bontott termék előállitása és aktivitásának vizsgálata

A 3.3.4 fejezetben leirtak alapján előállitott bontott terméket mikrobiológiai teszttel vizsgáltuk meg abból a célból, hogy milyen aktivitást mutat fonalasokkal és élesztővel szemben. A kisérletben szereplő két organizmus szaporodására gátló hatást nem fejtett ki.

A 16. ábrán bal oldalt a jóddal előhivott lemez látható. A futtató elegy hatására a bontott termék a start közelében marad, mig a bontatlan termék közel a frontvonal alatt helyezkedik el. Az ábrának a középső és jobboldali részén a mikrobiológiai teszteredménye látható. Ahol a bontott termék elhelyezkedik, ott a mikroorganizmusok teljes mértékü növekedést mutatnak, mig ahol bontatlan demetoxitylophorin helyezkedik el, teljes gátlás figyelhető meg.

A cryptopleurin származékok szintézise során Földeák számos "bontott" terméket állitott elő. Ezeket a 3.4. fejezetben leirt nyolc mikroorganizmussal, a bacillusokra gátló hatást kifejtő származékokat 15 baktériumra is megvizsgáltam. Az eredményeket a következő fejezetben ismertetem.

4.4. Kémiai szerkezet és a mikrobiológiai aktivitás közti összefüggések

A felsorolt 144 vegyület közül kettőt Madrasból kaptunk, egy vegyületet magam állítottam elő, a többit a JATE Szerveskémiai Intézetében Földeák és mts szintetizálták. 144-nél sokkal több vegyületet vizsgáltunk meg, de csak a felsoroltak voltak fontosabbak a a szerkezet és a biológiai aktivitás közti összefüggés bemutatására.

A kisérleti eredményeket a 2. táblázatban foglaltam össze. A táblázatok első oszlopában lévő számok a 3.4. fejezetben található vegyületek sorszámát jelenti. Az organizmusok neve alatt lévő számok kódszámok, jelentésüket az alábbiakban ismertetem:

1 = 2×10^{-4}	M	9 = $7{,}5 \times 10^{-7}$	M
2 = 10^{-4}	"	10 = $3{,}7 \times 10^{-7}$	"
3 = 5×10^{-5}	"	11 = $1{,}8 \times 10^{-7}$	"
4 = $2{,}5 \times 10^{-5}$	"	12 = 9×10^{-8}	"
5 = $1{,}25 \times 10^{-5}$	"	13 = $4{,}5 \times 10^{-8}$	"
6 = 6×10^{-6}	"	14 = $2{,}2 \times 10^{-8}$	"
7 = 3×10^{-6}	"	15 = $1{,}1 \times 10^{-8}$	"
8 = $1{,}5 \times 10^{-6}$	"		

A kódszámok azt a legkisebb koncentrációt jelentik, ahol az organizmus még nem fejlődött, de a következő higitásnál már telepeket képezett.

2. táblázat. A vegyületek aktivitása a felsorolt mikroorganizmusokkal szemben

Sor-szám	Sacch. cerevisiae	Cand. albicans	Cand. utilis	Geot. candidum	Asp. niger	Bac.cer var.mycoides	E.coli K_{12}	Actinomuc. repens
			Fenantroindolizidin származékok					
1	8	5	9	5	9	>5	>5	9
2	12	11	12	10	13	5	>5	12
3	9	9	8	7	11	>5	>5	11
4	>1	>1	>1	>1	>1	3	>1	>1
			Fenantrokinolizidin származékok					
5	11	12	11	8	12	>5	>5	11
6	7	6	7	5	6	5	>1	7
7	9	9	9	6	11	>5	>5	7
8	9	9	7	7	11	4	>1	11
9	12	10	12	10	12	>5	>5	12
10	1	1	1	1	2	2	>1	3
11	10	8	12	5	12	>5	>5	11
12	9	6	6	5	10	>5	>5	8
13	4	4	6	4	5	5	>1	6
14	6	5	5	5	7	>5	>5	6
15	4	3	4	1	4	2	>1	3

Sor-szám	Sacch. cerovisiae	Cand. albicans	Cand. utilis	Geot. candidum	Asp. niger	Bac.cer. var.mycoides	E.coli K_{12}	Actinomuc. repens
16	2	>1	>1	>1	1	>1	>1	>1
17	4	3	2	2	4	2	>1	2
18	3	>1	>1	>1	>1	>1	>1	5
19	5	5	5	6	6	5	>1	6
20	5	5	5	5	5	5	>1	5
21	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
22	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
23	7	7	8	7	8	7	>1	9
24	4	3	3	3	4	3	>1	4
25	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
26	1	>1	>1	>1	>1	4	>1	>1
27	1	1	1	3	4	4	>1	4
28	2	1	2	>1	3	2	>1	3
29	1	1	1	>1	5	3	>1	5
30	1	1	1	>1	7	4	>1	7
31	2	>1	>1	>1	>1	3	>1	>1
32	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1

Sor-szám	Sacch. cerevisiae	Cand. albicans	Cand. utilis	Geot. candidum	Asp. niger	Bac.cer. var.mycoides	E.coli K_{12}	Actinomuc. repens
33	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	5
34	5	5	5	5	5	5	>1	6
35	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
36	1	1	1	2	2	1	>1	2
37	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
38	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
39	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
40	6	6	5	6	7	3	>1	6
41	1	1	1	1	3	2	>1	3
42	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
43	1	>1	1	>1	1	2	>1	>1
44	2	>1	2	>1	>1	4	>1	2
45	>1	>1	>1	>1	>1	5	>1	>1
46	>1	>1	>1	>1	>1	4	>1	>1
			"Nyitott" származékok					
47	1	1	1	1	1	3	>1	1
48	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1

Sor-szám	Sacch. cerevisiae	Cand. albicans	Cand. utilis	Geot. candidum	Asp. niger	Bac.cer. var.mycoides	E.coli K_{12}	Actinomuc. repens
49	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
50	>1	>1	>1	>1	>1	3	>1	2
51	5	4	5	3	3	5	>1	5
52	5	3	3	3	4	5	>1	5
53	2	1	2	2	>1	2	>1	2
54	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
55	2	1	2	1	1	3	>1	2
56	1	>1	2	1	1	1	>1	1
57	4	1	2	1	1	2	>1	2
58	>1	>1	>1	>1	>1	1	>1	1
59	1	1	1	1	1	2	>1	1
60	1	1	1	>1	1	2	>1	2
61	3	2	3	1	2	>1	>1	2
62	5	5	5	5	5	6	>1	5
63	2	1	2	2	1	>1	>1	2
64	6	5	6	6	7	7	>1	6
65	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1

Sor-szám	Sacch. cerevisiae	Cand. albicans	Cand. utilis	Geot. candidum	Asp. niger	Bac.cer. var.mycoides	E.coli K_{12}	Actinomuc. repens
66	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
67	3	3	3	3	3	3	2	3
68	4	4	5	4	4	4	2	4
69	4	3	5	4	4	4	3	4
70	>1	>1	>1	>1	>1	2	>1	>1
71	6	4	6	4	5	5	>1	5
72	6	6	6	6	5	6	>1	6
73	3	>1	>1	>1	>1	2	>1	1
74	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
75	2	>1	1	1	>1	2	>1	1
76	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
77	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
78	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
79	2	1	1	>1	>1	2	>1	3
80	4	2	4	5	4	3	>1	6
81	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
82	2	2	2	1	>1	>1	>1	1

Sor-szám	Sacch. cerevisiae	Cand. albicans	Cand. utilis	Geot. candidum	Asp. niger	Bac.cer. var.mycoides	E.coli K_{12}	Actinomuc. repens
83	3	>1	2	3	3	2	>1	3
84	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
85	3	2	3	3	3	2	>1	3
86	4	3	4	3	4	4	>1	3
87	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
88	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
89	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
90	1	1	1	1	1	2	>1	1
91	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
92	6	3	5	4	4	4	>1	4
93	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
94	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
95	2	>1	2	>1	>1	1	>1	2
96	>1	>1	>1	1	3	>1	>1	1
97	1	>1	1	>1	>1	2	>1	>1
98	3	3	3	2	3	2	>1	3

Sor-szám	Sacch. cerevisiae	Cand. albicans	Cand. utilis	Geot. candidum	Asp. niger	Bac.cer. var.mycoides	E.coli K_{12}	Actinomuc. repens
				Szeko-fenaftrén származékok				
99	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
100	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	4
101	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
102	2	>1	2	2	2	2	>1	2
103	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
104	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
105	3	>1	1	>1	2	>1	1	2
106	2	>1	>1	>1	1	>1	>1	1
107	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
108	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
109	4	>1	3	2	3	2	>1	4
110	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
111	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
112	2	>1	2	>1	2	2	>1	2
113	1	>1	>1	1	1	2	>1	1
114	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
115	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
116	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1

Sor-szám	Sacch. cerevisiae	Cand. albicans	Cand. utilis	Geot. candidum	Asp. niger	Bac.cer. var.mycoides	E.coli K_{12}	Antinomuc. repens
117	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
118	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
119	2	>1	>1	1	2	1	>1	3
120	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
121	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
122	2	>1	2	1	2	1	>1	2
			E g y é b		s z á r m a z é k o k			
123	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
124	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
125	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
126	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
127	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
128	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
129	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1

Sor-szám	Sacch. cerevisiae	Cand. albicans	Cand. utilis	Geot. candidum	Asp. niger	Bac.cer. var.mycoides	E.coli K_{12}	Actinomuc. repens
130	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
131	3	3	3	3	3	2	>1	5
132	3	1	3	3	3	2	>1	3
133	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
134	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
135	5	4	5	4	3	4	>1	5
136	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
137	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
138	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
139	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
140	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
141	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
142	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
143	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
144	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1

A >5 >1 jelek jelentése az, hogy ez volt a legtömé-nyebb koncentráció, amelynél megvizsgáltam a gátló hatást, és a mikroorganizmusok ezen a koncentráción még telepet képeztek, tehát gátlásuk csak töményebb koncentrációnál biztositható. A 3.4. fejezetben felsorolt teszt mikroorganizmusokra megvizsgált vegyületek kémiai szerkezete és mikrobiológiai aktivitása közt a következő összefüggéseket tudtuk megállapitani.

Legaktivabbnak a Cyn.vincetoxicumból extrahált demetoxitylophorin /2/ mutatkozott. A Sacch.cerevisiaet 9×10^{-8}, a Cand.albicanst $1{,}8 \times 10^{-7}$, Cand utilist 9×10^{-8}, Geot. candidumot $3{,}7 \times 10^{-7}$, Asp.nigert 9×10^{-8}, Bac.cereus var.mycoidest $1{,}2 \times 10^{-5}$, E.coli K_{12} törzsét 10^{-4}, és Act.repenst 9×10^{-8} -on molos oldatban a felsorolt organizmusoknál teljes gátlást idéz elő. A felsorolásból jól látható, hogy egy rendkivül nagy hatásu, szélesspektrumu fungicid vegyület. A gombák törzsén belül egyaránt gátolja a Phycomyceteshez tartozó Actinomucor, az Ascomyceteshez tartozó élesztőket, és a Deuteromyceteshez tartozó élesztőket és az Asp.nigert. A megvizsgált két baktériummal szembe már kevésbé hatásos. A gombák és baktériumok között a hatásban négy nagyságrendü aktivitásbeli különbség van.

Tylophorin származékok közül aktivitás szempontjából a 14-OH-demetoxitylophorin /3/ és a tylophorinin /1/ következik. A 14-oxo-fenantroindolizidin /4/ gyakorlatilag inaktivnak adódott. Ezekből az eredményekből ~~az következik~~, azt a következtetést vontuk le, hogy a

fenantrén részen levő metoxi csoportok jelentősen hozzájárulnak a nagy aktivitás létrehozásához. Az /1/ vegyületnél a 7. szénatomon elhelyezkedő metoxi csoport gátlólag hat az aktivitásra. Ennek az a magyarázata, hogy árnyékolólag hat a nitrogénre, melynek rendkivül fontos szerepe van a hatás kialakitásában. A 14-es szénatomon elhelyezkedő OH és =O csoportok szintén jelentős mértékben hozzájárulnak az aktivitás csökkenéséhez.

A cryptopleurin származékok közül a növényből is izolálható cryptopleurin /5/ az egyik leghatásosabb. Valamivel hatásosabbnak mutatkozik az a származék, amelyiknél a 6.C atomon a metoxi csoportot klór helyettesiti /9/.

A legaktivabb vegyületek -/2/,/9/,/5/ a sorrend- szerkezetileg különbözők, mert a /2/ tylophorin /9/,/5/ cryptopleurin származék, de megegyeznek abban, hogy mind a három vegyületnek ugyanazok a C atomjai vannak elektronküldő szubsztituensekkel lekötve.

Aktivitás szempontjából tehát a fenantroindolizidin és a fenentrokinolizidin vegyületek között nincs különbség, ha azonosak a szubsztituensek minősége, mennyisége és izomeriája.

A cryptopleurin származékoknál az aktivitás a fenantrén részen elhelyezkedő szubsztituensek számától nagy mértékben függ. Hasonlitsuk össze a három metoxi csoporttal rendelkező /5/, a két metoxi csoportos /8/, az egy metoxit tartalmazó /23/ és a metoxi csoportot nem tartalmazó /29/, /3o/ vegyületek aktivitásbeli különbségét. Élesztők esetén három nagyságrendnyi, fonalasok esetén egy nagyság-

rendnyi különbség van a három metoxi csoportot tartalmazó származékok és a metoxi csoportot nem tartalmazó származékok közt, az előző vegyületek javára.

Azonos számu metoxi csoportok esetén azok elhelyezkedése a vázon döntően befolyásolják az aktivitást. Nézzük meg a fenantrokinolizidin csoportból a két metoxi csoportot tartalmazó /13/,/15/ vegyületeket, ahol a gombáknál egy nagyságrenddel aktivabb az a vegyület, mely a metoxi csoportot 2, 3 helyzetben tartalmazza. A /14/, /16/-os vegyületek esetében ez körülbelül két nagyságrendre növekszik. Hasonló eredményt kaptunk az egy metoxi csoportot tartalmazó /23/, /24/ vegyületek esetében is, ahol 6-os helyzetben lévő metoxi csoportot tartalmazó vegyület egy nagyságrenddel hatásosabb, mint ahol a metoxi csoport 8-as helyzetben helyezkedik el. A /2o/ /21/-es vegyületeknél még szembetünőbb a különbség, mivel a /21/-es vegyület gyakorlatilag inaktiv. A 9 fenantril-metil-piperidino származékoknál is hasonló helyzet áll fenn. Az /55/-ös vegyület, mely 2, 3 helyzetben tartalmazza a metoxi csoportokat, aktivabbnak mutatkozik a /9o/-es vegyületeknél.

Ezekből az eredményekből egyértelmüen azt a következtetést vontuk le, hogy a 7-es, 8-as helyzetben lévő metoxi csoportok azért gátolják jelentős mértékben a biológiai aktivitást, mert az aránylag nagy helyet elfoglaló metoxi csoport a N-t leárnyékolja.

Abban az esetben, ha metoxi csoport helyett klórt viszünk be a molekulába, általában nő az aktivitás mértéke.

Ezt jól demonstrálja a következő vegyületek összehasonlítása: /5/-öt a /9/-essel, /6/-ot a //11/-essel, /47/-et az /53/-mal. Egy-két higitási értékkel aktivabbnak mutatkozik a klóros származék. Találunk azonban pédát az aktivitás csökkenésére is /2o/,/22/-es vegyületeknél. A klór származékok fungicid hatása jól ismert,a gyógyszeriparban gyakran alkalmazzák. A klór aktivitás növelő hatása még szembetünőbb, ha olyan vegyületeket hasonlitunk össze, ahol a klór a hidrogén helyére lép be a molekulába, pl /67/, /71/, a /62/, /64/, az /57/, /51/, a /85/, /86/, valamint a /99/, /1o2/ jelzésü származékok esetén néhol nagyságrenddel aktivabb a klóros származék.

Ha a metoxi csoportokat metil csoportra cseréljük fel, azt tapasztaljuk, hogy az aktivitásban csökkenés áll be, mégpedig két felező higitással aktivabb a /23/-as vegyület a /34/-eshez viszonyitva, a /24/-es a /33/-ashoz képest pedig nagyságrenddel aktivabbnak mutatkozik. Ha viszont 6-os helyzetbe lép be a metil csoport a H helyébe, a metil csoportot tartalmazó vegyület nagyságrenddel aktivabbnak mutatkozik. Mivel mind a metoxi, mind a metil csoport elektronküldők, ezért a jelenséget nehéz megmagyarázni.

Nagy mértékben befolyásolják az aktivitást a 14-es C atomon lévő szubsztituensek is. Hasonlitsuk össze az azonos számu és elhelyezkedésü metoxi csoportot tartalmazó hidroxilos és hidroxilt nem tartalmazó vegyületek aktivitását. A cryptopleurin nagyságrenddel aktivabb a hidroxilos származékánál, a demetoxicryptopleurinnál is hasonló

aktivitásbeli különbség áll fenn. Két felező higitási léptékkel aktivabbak a hidroxilt nem tartalmazók a nekik megfelelő hidroxilos származékoknál : /9/, a /11/-hez képest, a /23/-as a /2o/-ashoz képest, a /24/-es a /21/-eshez képest. Ezt az aktivitásbelu különbséget azzel magyarázzuk, hogy a hidroxil csoport erősen hidrofil szubsztituens lévén, a lipoid membránon való átjutását a molekulának erősen gátolja.

Ha a 4. gyürü 14-es C atomján a H-t oxo csoporttal helyettesitjük, az aktivitás három nagyságrenddel csökken. Jól mutatja ezt a /18/-as vegyület. Az aktivitás nagy mértékü csökkenésének az a magyarázata, hogy az oxo csoport erősen elektronszivó, jelentősen csökkenti a N bázicitását. Ezek a vegyületek lugos közegben bázisként vannak jelen, disszociálatlan formában. A mikroorganizmusok csak ilyen alakban képesek felvenni.

A klór, $-OCOCH_3$ és $=N-NH_2$ csoportok amennyiben a 14-es C atom hidrogénjét helyettesitik, csökkentik a vegyület biológiai aktivitását /12/, /26/, /44/ vegyületek.

A 4. gyürü 9-es helyzetü C atomjára a H helyébe elektronküldő metil csoportot vittünk be /35/, abból a célból, hogy a N bázicitását kedvezőbbé tegyük. Aktivitás növekedést vártunk, de ezzel ellentétes eredményt kaptunk, mégpedig azért, mert a metil csoport elég nagy teret lefoglal, a N-t leárnyékolja. Ez a kisérlet is bizonyitja, hogy a N aktiv centrum a molekulában.

A fenantrén vázon azonos számu és elhelyezkedésü szubsztituensek esetén, jelentősen változik az aktivitás

a 4. gyürün elhelyezkedő hidroxil csoportok izomériáját változtatva. Összehasonlitva a /6/,/7/ vagy a /13/,//14/ vegyületeket, azt találjuk, hogy a B izomér közel egy nagyságrenddel hatásosabb. Az aktivitásbeli különbségnek az az oka, hogy az A izoméria esetén a hidroxil csoport H-je hidrogénhid kötést hoz létre a nitrogénnel.

Külön említést kell tenni a /4o/-es vegyületről, mely 2, 3 dihidroxi-fenantro-kinolizidin. Aktivitása megfelelőnek mutatkozott a mikrobiológiai tesztelés alkalmából, de mint később megtudtuk, az anyag szennyezésként jelentős demetoxicryptopleurint tartalmaz. Két érdekes származék a /45 és /46/-os vegyület. A táblázatban megadott mikroorganizmusokra hatástalannak mutatkoztak a 6o ug-os koncentrációban, de Bac.subtilis fejlődését még $1,2 \times 10^{-5}$ M-nál is gátolták.

Most nézzük meg, mi történik a biológiai aktivitással, ha radikálisabban avatkozunk a molekula szerkezetébe. A beavatkozáson azt értem, hogy a 14-es C atom "elhagyásával" különböző fenantrén származékokat kapunk, melyek aromatizálódni nem képesek. Igy fotostabil származékokat sikerült előállitani, eleget téve egyik célkitüzésünknek. A fenantrén váz C atomjához egy metil csoport kapcsolódik, melyhez különböző szubsztituenseket kapcsoltak Földeák és mts, keresve a legaktivabb származékot.

A fenantrén származékok közül elsőként szintetizálták a /48/, /49/,/5o/-es vegyületeket. Mind a hármat inaktivnak találtuk. Legalábbis az általunk alkalmazott

legtöményebb koncentrációnál a mikroorganizmusok teljes fejlődést mutattak. Azért vizsgáltuk csak 2/1ooooo M-ig, -ami gyakorlatilag 6o µg-nak felel meg- mert gyógyszerként vagy növényvédőszerként ennél nagyobb koncentrációban alkalmazva már nem kifizetődő.

Ezt követően a 9-fenantril-metil-ciklusos aminok előállitása következett. A ciklusos-aminok csoportján belül szintetizáltak 9-fenantril-metil-piperidinot, 9-fenantril-metil-pirrolidinot és 9-fenantril-metil-morfolinot. Aktivitásukat vizsgálva azt az eredményt kaptuk, hogy a teszt organizmusokkal szembeni biológiai aktivitásuk a felsorolt sorrendben csökkent /53/,/56/,/54/.

Érdekesen alakul az aktivitás a 9-fenantril-metil-piperidino származékoknál a metoxi csoportok változtatásával. Ellentétes eredményt kapunk, mint.az 5 gyürüs vegyületek esetében. Hasonlitsuk össze a 3,2,1 metoxi csoportot tartalmazó és a metoxi csoportot nem tartalmazó piperidino származékokat /47/, /55/, /61/, /62/. Az aktivitás az előbb felsorolt sorrendben nő. A metoxi csoportot nem tartalmazó vegyület két nagyságrenddel aktivabb a 3 metoxit tartalmazó származéknál.Ezeket az eredményeket konzekvensen kaptuk, de magyarázatát még nem tudjuk. Feltehetően más a hatásmechanizmusuk ezeknek a vegyületeknek, melyet azonban még eddig nem vizsgáltunk. Ha a 9-fenantril-metil-piperidino 6-os C atomán lévő H-t klórral helyettesitjük, /53/, /64/ az aktivitás növekedik.

A piperidino részre szubsztituált metil csoport /98/ két felező higitással csökkenti az aktivitást /62/.

Készitettek még különböző piperidino származékokat /91/, /92/, /93/, melyek közül a /92/ tünik ki jelentős aktivitásával. A többi származék gyakorlatilag inaktiv. Némi aktivitás tapasztalható a /73/ származéknál. A difenilamin származék a Sacch.cerevisiaet 5×10^{-5} M-ig gátolta.

Jelentős aktivitásbeli növekedést vártunk a 9-fenantril-etil-piperidino származékoktól. Az elvárást arra alapoztuk, hogy a metil származékoknál a cryptopleurin váznak "alsó" elemei maradtak meg az etil származékkal egy forditott szerkezetü vegyületet próbáltak szintetizálni. A /83/, /85/, /86/-os vegyületek azonban jelentősebb aktivitást nem mutatnak, sőt még olyant sem, mint a hasonló szubsztituensekkel rendelkező metil származékok.

Összegezve a ciklusos aminok biológiai aktivitását, végső következtetésként megállapithatjuk, hogy a 4 legaktivabb származék a /62/,/64/,/92/,/86/.

Az alifás aminok közül a következő tipusu vegyületeket kapcsolták a fenantrén vázhoz: i-propilamin, i-butilamin, n-butilamin. A megvizsgált származékok aktivitása az előbb felsorolt sorrendben nő, a fenantrén vázon azonos számu és elhelyezkedésü szubsztituensek esetén. Az /57/,/59/,/60/ vegyületek közül az /57/-es n-butil-amin a legaktivabb. A lánc hosszuság befolyásolja a származékok biológiai aktivitását. Ezt demonstrálják az /51/,/52/-es vegyületek is.

A piperidino származékoknál tapasztaltakhoz hasonlóan itt is aktivabbnak mutatkozik a metoxi csoportot nem tartalmazó származék a metoxi csoportot tartalmazóhoz képest. Hasonlitsuk össze a /6o/,/67/ és a /68/,/59/ vegyületek aktivitását. Azt léthatjuk, hogy a metoxi nélküliek nagyságrenddel aktivabbak. Kivételt képeznek az N-acetil-izobutil származékok, de ezeknél a N-hez kapcsolt acetilc csoporttal a N aktiv centrumként való működését meggátoltuk.

A fenantrén váz 6-os C atomján lévő H-nek klórral való kicserélése itt is aktivitást növelő hatást fejt ki /71/,/72/.

Földeák és mts készitettek még ezeken kivül igen különböző termékekeket, ezek közül az n-butilétert /78/ e tio-oktilétert /76/ emlitem, sajnos mind a kettő inaktiv. Az alifás aminok közül a /72/,/71/,/68/,/69/ mutatkozott legaktivabbnak, a felsorolt sorrendben.

Külön csoportot képviselnek a szeko-fenantrén vázas vegyületek, melyekből szintén szintetizáltak ciklusos és alifás származékokat. Összesen 24 ilyen származék készült, melyek nagy része inaktivnak bizonyult a biológiai vizsgálatok során.

A ciklusos aminok közül csak a /1oo/,/1o1/,/1o2/-es vegyületek érdemelnek emlitést. Mind a három származék klórt tartalmaz.

Az alifás aminok közül csak a /1o9/-esnél találtunk olyan aktivitást, ami gyakorlati felhasználását lehetővé teszi.

Az eddigiekben a szubsztituensek aktivitást módosító szerepét vizsgáltuk, most nézzük meg a másik aktiv centrumnak a könnyen quaternerezódő N-nek szerepét a hatás kialakitásában.

Ha a N négy vegyértékét kötik le C atomok, ugy a vegyületek gyakorlatilag inaktivvá válnak. Ezt a megállapitást bizonyitják a /32/, /36/, /42/, /43/-as vegyületek.

Földeák szerint a tylophorin és cryptopleurin származékok a már leirt átalakuláson mennek keresztül. A 15. ábráról leolvasható, hogy fény hatására első lépésként a /32/, /36/ tipusu vegyületek keletkeznek, melyek a közegtől függően azonnal tovább alakulnak. Igy savas közegben a /1o/,/31/,/41/ tipusu,tautomér átrendeződéssel /42/,/43/-as származékok alakulnak ki. Azt az érdekes eredményt tapasztaltuk, hogy a 4. gyürüben kettős kötést tartalmazó vegyületek a Bac.subtilisre jelentős gátlást fejtenek ki. Ezért megvizsgáltuk a /31/,/41/ és a /32/, /36/ jelzésü bontott származékokat több baktériumra is. A felsorolt vegyületek hatásának eredményét az alábbiakban ismertetem. Az organizmusok neve után lévő számok jelentése ugyanaz, mint az előzőleg megadott táblázatban.

Organizmusok	A legkisebb teljes gátlást okozó koncentráció			
	/31/	/41/	/36/	/32/
Bacillus thermophilus	5	5	5	5
Bacillus coagulans	3	4	4	3

Bacillus mesentericus	1	3	3	2
Bacillus circulans	3	4	4	3
Bacillus brevis	1	2	4	3
Bacillus macerans	4	5	5	3
Bacillus polymyxa	4	4	4	3
Escherichia coli	1	1	1	1
Bacillus subtilis	8	6	7	6
Bacillus cereus var.mycoides	3	3	3	4
Sarcina lutea	4	5	3	4
Serratia marcescens	1	1	1	1
Proteus vulgaris	1	1	1	1
Salmonella typhi	1	1	1	1
Staphylococcus aureus	2	3	4	3

A táblázatból leolvashatjuk, hogy a bacillusok általában érzékenyek a vegyületre, hiszen 5 x 10^{-5} mol hatóanyagot tartalmazó táptalajon már nem fejlódtek. A Bac. subtilis nagyon érzékenynek mutatkozik ezen vegyületekkel szemben, éppen ezért csak szelektiv jellegü hatásról beszélhetünk. Ugyanezt tapasztaltuk a /42/,/43/ vegyületeknél is.

A N biológiai aktivitásban betöltött kulcs szerepének bizonyitására olyan származékokat állitottak elő, és vizsgáltunk meg, melyeknek szerkezeti képletei megegyeztek a korábban vizsgált, aktivnak mutatkozó vegyületekkel. Ezeknél a N-t C-re /37/,/38/,/87/,/88/ S-re /76/,/94/

O-re /77/,/78/ cserélték ki.Ezek a vegyületek aktivitást nem mutattak a biológiai vizsgálatok során.

Megvizsgáltunk még számos olyan származékot, melyek A fent felsorolt tipusokba nem illeszthetők be, igy antracén származékokat /125/,/128/ közti termékeket:/126/,/127/, /129/,/13o/, fenil-dehidro-indolizidin /139/,/14o//141/ fenil-dehidro-kinolizidin /142/ vegyületeket, melyek mind inaktivak voltak. Az egyéb származékok közül némi hatást tapasztaltunk a /131/ és /132/fenilhidrazin származékoknál, amennyiben 5 x 10^{-5} M-nál gátolják a gombák növekedését.

Legaktivabbnak a /135/-ös vegyület mutatkozott, mely általában 1.2 x 10^{-5} M-nál teljes gátlást idézett elő gombáknál és a Bac.cereus var.mycoides törzseknél. Érdekes a /125/-ös vegyület, amelyen a metoxi csoportok a cryptopleurin vázhoz hasonlóan helyezkednek el, de ennek ellenére a vegyület inaktiv.

Az aktivitás vizsgálata során számunkra kedvező, érdekes eredményt vettünk észre. A szubsztituensek nélküli, sima fenantro-kinolizidin váz /29/,/3o/ a kisérletekben alkalmazott teszt mikroorganizmusoknál jelentős szelektivitást mutatott az élesztők, és fonalas gombák között. Az élesztőket csak 2 x 10^{-4} M-nál, a fonalasokat már 10^{-6} - nál teljes mértékben gátolták. Ezért 65 gomba törzsön megvizsgáltuk, hogy a két vegyület szelektiv hatása általánosnak mondható-e. Az eredményeket az alábbi táblázat-

ban ismertetem. A mikroorganizmusok neve után levő kódszámok jelentése ugyanaz, mint az előző táblázatokban.

A /3o/-as vegyületre bevizsgált mikroorganizmusok	A legkisebb teljes gátlást okozó koncentráció
Mucor racemosus	4
Mucor hiemalis	4
Mucor fragilis	4
Mucor alboater	4
Circinella v. simplex	4
Rhizopus arrhisus	4
Pestalozzia sp.	4
Penecillium chrysogenum	5
Penicillium pallidum	4
Penicillium expansum	6
Penicillium cyclopium	6
Penicillium frequetans	4
Penicillium luteum	6
Penicillium biverticulum	3
Aspergillus oryzae	2
Aspergillus glaucus	2
Aspergillus versicolor	6
Aspergillus wentii	6
Aspergillus fumigatus	3
Aspergillus niger	3

Aspergillus proliferans	4
Aspergillus japonicus	3
Trichoderma glaucus	4
Dicoccum sp.	3
Alternaria tenuis	4
Fusarium moniliforme	3
Fusarium poe	4
Adtinomucor repens	5
Trichophyton mentagrophytes	2
Microsporon cookei	4
Microsporon fulvum	4
Absidia orchidis	5
Mortierella pusilla	4
Scopulariopsis brevicaulis	4
Schizosaccharomyces octosporus	3
Saccharomyces chevalieri	4
Saccharomyces heterogenicus	4
Saccharomyces carlsbergensis	5
Saccharomyces ludwigii	3
Saccharomyces pasteurianus	2
Saccharomyces cerevisiae	3
Endomycopsis wickerhamii	1
Hansenula anomala	1
Hansenula subpelliculosa	1
Dekkeromyces fragilis	4
Nematospora gossipy	3

Geotrichum linkii	1
Geotrichum candidum	1
Trichosporon	4
Procandida tropicalis	2
Procandida albicans	1
Debaryomyces globosus	1
Candida solani	1
Candida utilis	5
Candida requinyii	2
Candida pulcherrima	2
Candida guillermondi	1
Candida guillermondi	1
Torulopsis capensis	3
Kloeckera apiculata	2
Nigrococcus nigricans	3
Rhodotorula rubra	2
Rhodotorula mucilaginosa	2
Zygosaccharomyces cavarae-beanuveri	2
Pék	3

Azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a /3o/-as származék szelektivitása törzsjellegü, csak a mi teszt organizmusainknál van két nagyságrendnyi különbség az aktivitásban. Kismértékü szelektivitás azonban kimutatható az élesztők és fonalasok között, amennyiben 10^{-4}-en általában nem hat az élesztőkre, mig 2,5 x 10^{-5} M a fona-

lasok között, amennyiben 10^{-4} -en általában nem hat az élesztőkre, míg 2,5 x 10^{-5} M a fonalasokat visszaszoritja.

4.5. Demetoxicryptopleurin felvétele és a sejtekből való kilépésének aránya sötétben és fényen

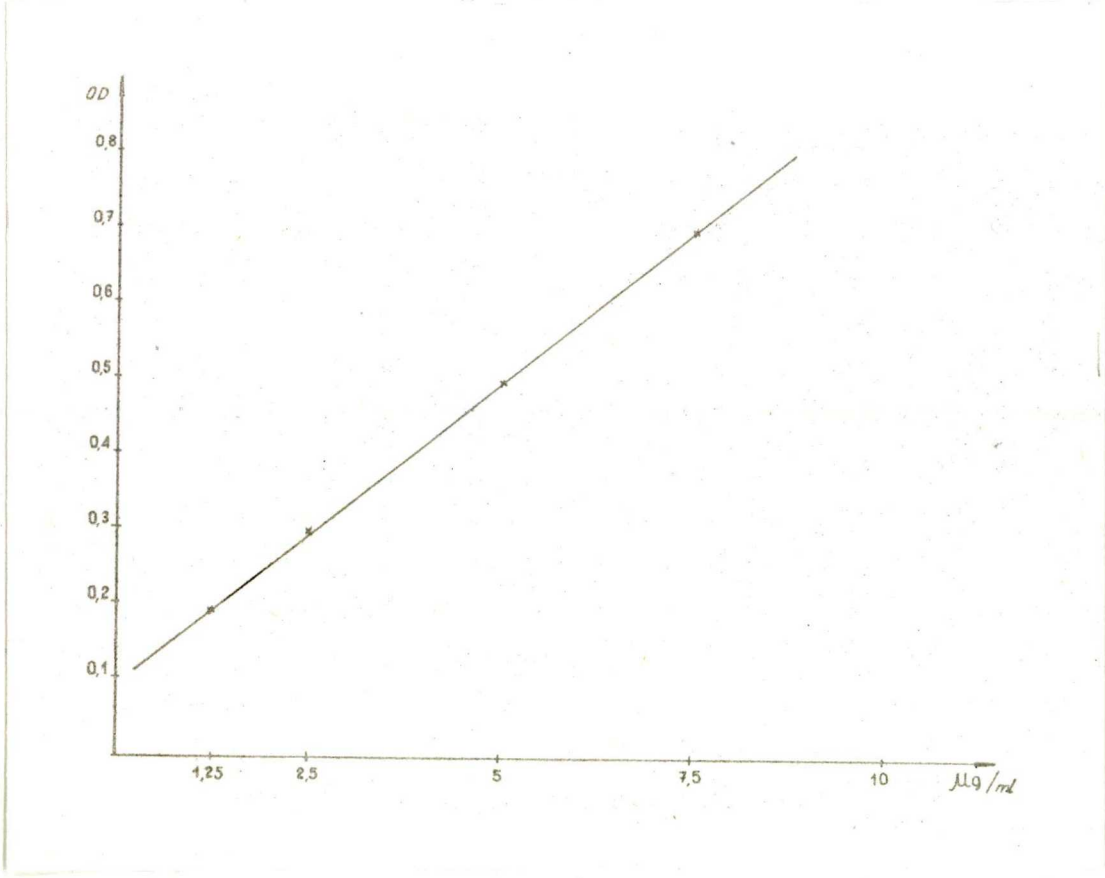
A kisérletet abból a célból állitottuk be, hogy az élesztősejtek a közegben jelenlevő aktiv fungicid vegyületekből 0, 15, 3o, 45 perces kezelés után a hatóanyag hányad részét veszik fel. Továbbá feleletet vártunk arra is, hogy a vegyületet felvett sejtek 6o perces inkubálás után a hatóanyag hányad részét bocsájtják ki sötétben és fényen.

A 3. táblázatról a szupernatans és a mosófolyadékok extinciós értéke olvasható le. Minden mintánál a három extinciós értéket összeadtam, és az igy kapott összegből kivontam a kontroll értékét. Kalibrációs görbéről leolvastam, hogy az igy kapott érték hány µg/ml hatóanyagnak felelmeg.

0 percnél a közel 4 µg/ml-es hiány azzal magyarázható, hogy az 5 perces centrifugálási idő alatt a sejtek felvették a közegből a hatóanyagot.

15, 3o, 45 perces kezelés között a visszamaradt hatóanyag mennyiségében lényeges különbség nincs. 0 és 15 perces

kezelés között viszont jelentős különbség tapasztalható.



17. ábra. Demetoxitylophorin felezőhigitásának OD értékei 262 nm-nél Spectpomom 202-es fotométerrel kvarc küvettában felvéve

A 4. táblázatban feltüntettük a sejtekből fényen és sötétben 60 perces inkubálás alatt kilépett demetoxitryptopleurin mennyiséget.

Sötétben és fényen kezelt sejtekből a megadott időminták alatt az eslő oszlopban megadott extinciós értékeknek megfelelő mennyiségü hatóanyag lépett ki.

3. táblázat. A sejtek által fel nem vett hatóanyag

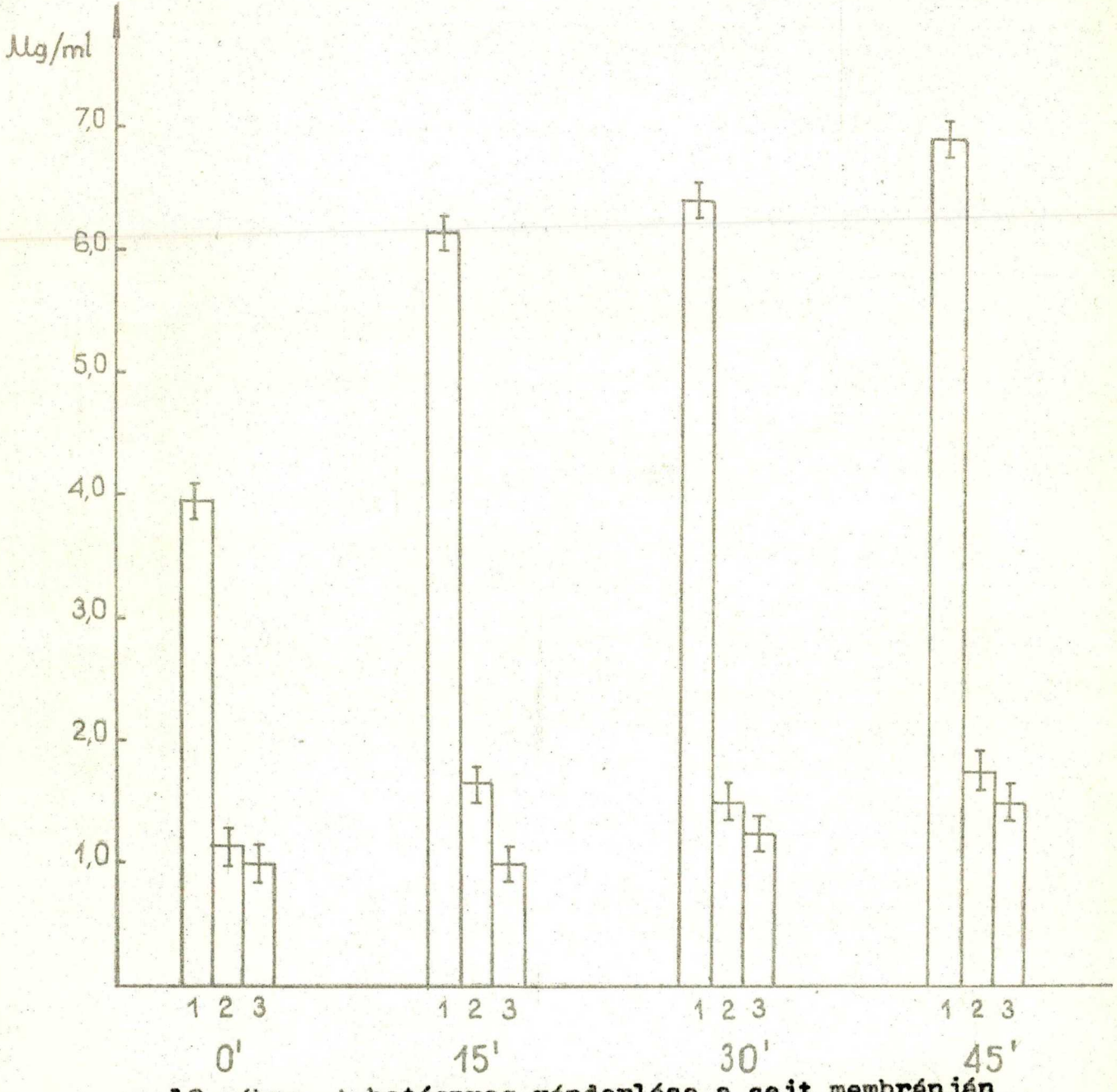
Idő /perc/	Extinció értékek			Pufferben maradt vegyület ug/ml
	Szupernatans	Első mosófolyadék	Második mosófolyadék	
45	0,250	0,115	0,125	3,10
30	0,300	0,135	0,100	3,60
15	0,330	0,125	0,100	3,85
0	0,530	0,105	0,095	6,05
K	0,145	-	-	-

4. táblázat. A sejtekből 60 perces inkubálás után kilépett hatóanyag mennyisége

Idő /perc/	Extinciós értékek sötétben		Kilépett vegyület ug-ban	Extinciós értékek fényen		Kilépett vegyület ug-ban
	közvetlen mért	kontrollal csökkentve[x]		közvetlen mért	kontrollal csökkentve	
45	0,265	0,240	1,75	0,255	0,220	1,50
30	0,255	0,220	1,50	0,245	0,200	1,25
15	0,260	0,230	1,65	0,230	0,170	1,0
0	0,240	0,190	1,15	0,230	0,170	1,o
K	0,145	-	-	-	-	-

x A kontrollal csökkentett értékek kettővel meg vannak szorozva.

1. a sejtbe belépett hatóanyag, µg-ban
2. a sejtből kilépett hatóanyag sötétben, µg-ban
3. a sejtből kilépett hatóanyag fényben, µg-ban



18.ábra. A hatóanyag vándorlása a sejt membránján sötétben és fényen az idő függvényében

Ezeket az értékeket csökkentettem a kontroll értékével, mivel magas extinciós értéket kaptunk minden esetben a kontrollra, ami azzal magyarázható, hogy a sejtekből jelentős mennyiségü aromás vegyület lépett ki. A kontrollal csökkentett extinciós értékeket azért szoroztam kettővel, mert az eredeti szuszpenziót duplájára higitottam. A fényen és sötétben inkubált sejtek által kibocsájtott hatóanyag µg/ml-ben kifejezett értékei a 4. táblázatból leolvasható.

Értékelve a kapott eredményeket azt az egyértelmü következtetést vonhatjuk le, hogy jelentős különbség nem tapasztalható a különböző időminták között.

A 18.ábráról is ugyanez olvasható le. Az 1-gyel jelölt oszlopok itt a sejtekbe belépett vegyületet jelentik µg/ml -ben. Ezeket az eredményeket ugy kaptam meg, hogy a pufferben maradt hatóanyag µg/ml -ben kifejezett értékeit kivontam 1o µg/ml -ből, mivel az oldatot ugy állitottam össze, hogy 1o µg vegyületet tartalmazott ml-ként. A $^{2-}$ vel a sötétben, 3-mal a fényen történő 6o perc alatt kibocsájtott hatóanyag mennyiségeket tüntettem fel. Jelentős különbség nem tapasztalható a kétféle kezelés között.

A kisérlet elején feltett kérdésekre egyértelmü választ kaptunk. Megtudtuk, hogy különböző idő alatt a sejtek mennyi hatóanyagot képesek felvenni. Választ kaptunk arra a kérdésünkre is, hogy van-e különbség fényen és sö-

tétben tartott sejtek között a vegyület kibocsájtását illetően.

Ezeket a kisérleteket összekapcsoltuk sejtszámlálással is, de annak eredményei a rendkivül nagy szórás miatt nem értékelhetők egyértelmüen.

4.6. Fenantrén származékok toxicitásának vizsgálata

A származékok előállitásával az volt a célunk, hogy a Cynanchum vincetoxicumból extrahált fotolabilis és erősen toxikus, de nagy hatásu fungicid vegyület helyett egy fotostabil, fiziológiai elváltozást nem okozó vegyületet találjunk. A "nyitott" származékok az első kritériumnak teljes mértékben eleget tesznek, hiszen nem rendelkeznek sem az indolozidin, sem a kinolizidin vázzal, amely aromatizálódni tudna.

A toxicitásról ugy győződtünk meg, hogy az elfogadható aktivitást mutató fungicid vegyületeket több napon keresztül a kisérleti részben leirtak alapján patkányok bőrére ecseteltük.

Többszöri ismétlés alapján a következő, eredményt kaptuk:

Vegyület	Hatás
/2/	+++
/9/	+++
/5/	+++
/6/	+
/14/	+
/3o/	-
/38/	-
/72/	-
/68/	-
/62/	-
/64/	-
DMSO	-
Kontroll	-

- +++ -val jelöltük azt a hatást, mely a kezelt bőr felületén 48 óra mulva kisebesedést okozott, és 72 óra mulva egybefüggően megkérgesedett.
- + jellel jelöltük azt a hatást, mely pontszerű sebesedést idézett elő.
- - jellel jelöltük a teljesen ép, a kontrollhoz hasonló bőrfelületet.

A fenti kisérleti eredményekből azt a következtetést vontuk le, hogy a fungicid hatás szempontjából legaktivabb vegyületek /2/, /9/, /5/ erőteljes hólyaghuzó hatást

is előidéznek az emlősök bőrén. A sebesedés erőteljes viszketéssel jár, amelyet magunk is éreztünk.

A fenantrokinolizidin, a benzpirén és a fenantro-alifás és ciklusos származékok /30/,/38/,/72/,/68/,/62/, /64/ sebesedést nem idéztek elő. A szőrtelenítés után a vegyülettel való kezelés ellenére a 9. napon a kontrollhoz hasonlóan kezelt felületeken a szőrképződés megindult.

Természetesen ezen kísérletek alapján nem jelenthetjük ki, hogy a /72/,/68/,/62/,/64/ vegyületek nem toxikusak, de mindenesetre az eredmények biztatóak. Alapot adnak arra, hogy gyógyszerhatástani vizsgálattal el lehessen dönteni, bekerülhetnek-e valamilyen formában a gombák elleni védekezőanyagok sorába.

Ö S S Z E F O G L A L Á S

A növénynek mind a vegetativ, mind a generativ részéből készült metszetek alapján megállapitottuk, hogy az alkaloida előfordulása a növényben három főbb helyre korlátozódik. Legnagyobb mennyiségben a fanyalábokban található, kevesebb van az epidermiszben, és elenyésző mennyiségben van más szövetek sejtjeiben.

Cynanchum vincetoxicum 6 kg szárez gyökeréből előállitottunk 15o mg demetoxitylophorint. Az alkaloida tisztitását preparativ rétegen végeztük el.

Demetoxitylophorint széntetrakloridban 6oooo luxon elbontjuk, pelyhes csapadék formájában kiválik. A bontott származékról megállapitottuk, hogy sem fonalas gombák, sem élesztők növekedését nem gátolja, a nagyhatásu fungicid vegyület fényen inaktivvá válik.

A megvizsgált 144 vegyületről megállapitottuk, hogy legaktivabb a Cynanchum vincetoxicumból extrahált demetoxitylophorin. Nagy hatást tapasztaltunk a szintén növényből izolálható cryptopleurinnál is.

A JATE Szerveskémiai Intézetében előállitott származékok két nagy csoportra oszthatók. Az egyik csoport vegyületei a demetoxitylophorinhoz képest a szubsztituensek számában, helyzetében, izomériájukban térnek el. Ebben a csoportban több közepes hatásu fungicid vegyületet találtunk, melyek fotostabilak, és az állat kisérletek - ben nem idéztek elő elváltozást a bőrön.

A másik csoportba tartoznak azok a származékok,melyeknél a N bázicitását befolyásoltuk, a N-t "leárnyé - koltuk", vagy a N-t C-re, S-re, O-re cseréltük.

Megállapitottuk, hogy a demetoxitylophorin szerkezetében bármilyen változtatást eszközlünk, az aktivitás minden esetben csökken.

Kismértékü a változás akkor, ha az indolizidin vázat kinolizidin vázra cseréljük,ha a metoxi csoportot más elektronküldő csoporttal helyettesitjük. Nagymértékü a változás, ha a metoxi csoport számát csökkentjük, ha a 4.gyürü felszakad, vagy ha a N-nel a fent emlitett változtatásokat végezzük el. Igy gyakorlatilag inaktiv származékokat kapunk.

Meghatároztuk a hatóanyag felvételt az idő függvényében, majd a fényen és sötétben kilépett vegyület mennyiségét. A két érték közt jelentős különbséget nem tapasztaltunk.

Megvizsgáltuk 11 származék toxicitását patkányok bőrén. A kisérletbe bevont vegyületek közül a nagy fungicid hatást kifejtő tylophorin és cryptopleurin származékok erőteljes hólyaghuzó hatást fejtettek ki, mig azoknál az alifás és ciklusos fenantrén származékoknál melyek csak közepes fungicid hatásuak, toxicitást nem tapasztaltunk.

Ezek a kisérletek ugy érezzük elegendők ahhoz, hogy a Cynanchum vincetoxicum alkaloidjáról átfogó képet adjanak. Reméljük, hogy a közepes hatásu származékok, melyek

hólyaghuzó hatást nem idéznek elő, a mycozisok ellen a gyakorlatban is hatásosnak bizonyulnak.

I R O D A L O M

Akačič,B., Marković,D., Petričić,I. /1951/: Acta Pharm. Jugosl., 1, 3.

Belkhode,M.L., Gotto,A.M., Touster,O. /1967/:Cancer Res., 27, 1o73.

Benjamin,B.D., Mulchandani,N.B./1973/: Planta Medica.,23,394.

Berek,I./1971/: Doktori disszertáció.

Bock,H./1731/: Kreuterbuch, Basel.

Bradsher,C.K., Berger,H./1958/: J.Am.Chem.Soc., 8o, 93o.

Chaze,I./1931/: Compt.rend., 192, 1268.

Chaze,I./1932/: Ann.sci.nat. Botan., 14, 5.

Chitnis,N.P., Khandalekar,D.P.,mts /1972/: Indian J.Med. Res., 6o, 559.

Clautriau,G./1889/: Ann.Soc.Belge.Microscopie.,12, 67.

Clautriau,G./19o6/: Rec.l'inst.bot.Bruxelles., 2, 237.

Cleland,K.W./195o/: Aust.J.Sci., 12, 144.

Clinquart,E./1929/: Bull.Acad.Roy.Med. Belg., 5, 627.

Conner,H.W./1937/: Plant.Physiol., 12, 6o1.

Cook,E., Haynes,K./1954/: Aust.J.Chem., 7, 99.

Copra,R.N., Ghosh,N.N.,mts/1937/: Arch.Pharm., 275, 236.

Cromvell,B.T./1933/: Biochem.J., 27, 86o.

Czapek,F./1925/: Biochemie der Pflanzen.,Fisher,Jena,3,231.

Davey,P.I., Haslam,I.M., Linnane,A.W./197o/: Arch. Biochem.Biophys., 136.

Davies,I./1974/: személyes közlés.

Deleano,N.T., Vladescu,I.D./1937/: Bull.soc.chim.biol.,19,1366.

Dioscorides /i.u.46/: De materia medica., 4o .

Donaldson,G.R., Atkinson,M.R., Murray,A.W./1968/: Biochem. Biophys.Res.Comm., 31, 1o4.

De Drog,E./19o6/: Rec.ℓ'inst.bot.,Bruxelles., 2, 347.

Errera,L./19o6/: Rec.ℓ'inst.bot., Bruxelles., 2, 185.

Errera,L., Maistriau,P., Clautiau,G./19o6/: Rec.ℓ'inst. bot., Bruxelles., 2, 147.

Ewing,L./1953/: Aust.J.Chem., 6, 78.

Fairbairn,J.W., Kapoor,L.D./196o/: Planta Med. 8, 49.

Ferenczy,L.,Horváth,K.,Zsolt,J./1965/: Előadás, Nemzetközi Gyógynövény Szimpozion.

Ferenczy,L.,Zsolt,J.,Héznagy,A.,Tóth,L.,Szendrei,K. /1965-66/:Sci.Hung., 12, 337.

Ferenczy,L./1972/: Személyes közlés

Fischer,R., Thiele,I./1929/: Oesterv.bot.Z., 78, 325.

Fouchs,L./1549/: Commentaires tres exellens de ℓ'hystoire des plantes.

Fridrichsons,I., Mathieson,N./1954/: Nature., 173, 732.

Gellert,E., Riggs,N.V./1954/:Aust.J.Chem., 7, 113.

Gellert,E.,mts./1962/: Chem.Soc., 1oo8.

Gellert,E.,Govindachari,T.R.,mts./1962/: J.Chem.Soc. 1oo8.

Gellert,E., Rudzats,R./1964/: J.Med.Chem., 7, 361.

Govindachari,T.R.,mts./1961/: Tetrahedron, 14, 288.

Govindachari,T.R. /1967/: The Alkaloids, Akad.Press New York - London.

Granick,S./1937/: Plant.Physiol., 12, 79.

Hart,N.K., Johns,S.R.,Lamberton,I.A./1968/:Aust.J.Chem.,21,1397.

Háznagy,A.,Tóth,L.,Szendrei,K./1967/:Acta Pharm.Hung.,37, 186.

Hegnauer,R./1964/:Chemotaxonomie der Pflanzen,Basel-Stuttgart.

Hegyes,P. /1973/: Doktori disszertáció.

Henry,T.A./1949/:The Plant Alkaloids 4 th.ed.,The Blaikston Co.

Herbert,R.B.,Moody,C.J./1927/: Phytocem., 11, 1184.

Hesse,G.,Mix,K. /1959/: Ann. Chem., 625, 146.

Hesse,G., Ludwig,G./1960/: Ann.Chem., 632, 158.

Hoffmann,J./1952/:Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci., 30, 541.

Hooper,D./1891/: Pharm.Journ., 21, 6.

Hougland,D.R./1944/: Inorganic.Pant.Nutrition.Chronica Botanica CO.,Waltham.

Jacquemin,A./1906/: Rec.l'inst.bot. Bruxelles., 6, 257.

James,W.O./1967/:The Alkaloids,Akad.Press. New York - London

Johns,S.R., Lamberton,J.A., mts. /1970/: Aust. J. Chem., 23, 353.

Johns,S.R., Lamberton,J.A., mts./1970/: Aust. J.Chem.,23,353.

Juckernack,A.,Gribel,G./1910/:Untersuch Nähr.u.Genussm., 19, 571.

Kevei,F./1968/: Doktori disszertáció.

Kisser,T./1926/:Leitfaden der botanischen mikrotechnik.Jena

Klein,G./1931/:Handbuch der Pflanzenanalyse,Springer Verleg, Wien.

Krompotic,E.,Farnsworth,N.R.,Messmer,W.M. /1972/: J. Pharm. Sci., 61, 1508.

de la Lande,J.S./1948/: Exp.Biol.Med.Sci., 26, 181.

Lewis,M./1775/: Conoissanc pratique des medicamens les plus salutaires.

Littlefield,J.W.,Keller,E.B./1957/:J.Biol Chem., 224, 13

Lotsy,I.P./1897/: Botan.Centr., 71, 395.

Marachini,A.,Belleau,R./1958/: Cau.J.Chem. 36, 581.

Marion,L./1939/: Canad.J.Res., 17B, 21.

Massicot,M.I./1961/: Ann.Pharm.Franc. 19, 44.

Molle,Ph. /1906/:Rec.l'inst.bot. Bruxelles., 2, 281.

Molle,Ph. /1906/:Rec.l'inst.bot. Bruxelles., 6,57

von Morgestein,P./1906/: Landw.Vers.-Sta., 65, 301.

Mou-Tuan Huang,Crollman,A.P./1972/:Molecular Pharm.,8, 338.

Mothes,K./1928/: Planta., 5, 563.

Mothes,K.,Schütte,H.R./1969/: Biosynthese der Alkaloide, Verlag der Wissenschaften, Berlin.

Mulchandani,N.B., Iyer,S.S., Badheka,L.P./1969/:Phytochemistry., 8, 1931.

Neubauer,D./1964/: Planta Medica., 12, 43.

Novák,I., Héznagy,A., Szendrei,K., Tóth,L./1973/: Gyógynövény és drogismeret.

Pailer,M.,Streicher,W./1965/: Monatsh.Chem., 96, 1094.

Pfeifer,S.,Heydereich,K./1961/: Naturwiss., 48, 222.

Pfeifer,S./1962/: Pharmazie., 17, 467.

Platonova,T.F.,Kuzovkov,A.D.,Massagetow,P.S./1958/: J.obschtsch.Chim., 28, 3131.

Polya,G.M. /1968/:Aust.J.biol.Sci., 21, 1107.

Prianischnikov,D.N.,Schulov,I./1910/:Ber.deut.botan.Ges., 28, 253.

Rao,K.V./1960/:Results cited in Chem.Eng.News., 44, 253.

Rao,K.V.,mts./1970/: J.Pharm.Scie., 60

Ratnagiriswaran,A.N., Venkachalam,K. /1935/: Indian J. Med.Res., 22, 433.

Russel,J.H./1963/: Naturwissenschaften., 50, 443.

Sabalitschka,I.,Jungermann,C./1925/:Biochem.Z., 163, 445.

Sárkány,S.-Szalai,I./1957/: Növényszervezetteni gyakorlatok, Tankönyvkiadó, Budapest.

Sárkány,S.,Dános,B.,Farkas-Riedel,L./1963/: Abh.Dtsch. Akad.Wiss. Berlin,Kl.Chem.Geol.Biol., 4, 247.

Sárkány,S.,Verzárné, Michelsné,Sárkányné./1966/: Herba. Hung., 5/2-3, 40.

Smirnov,A.I./1928/: Planta., 6, 687.

Steward,F.C./1935/: Ann.Rev.Biochem., 4, 519.

Stock,I.,Földeák,S./1972/: személyes közlés

Szalai,I.,Frenyó,V./1957/: Növényélettani Gyakorlatok, Tankönyvkiadó, Budapest.

Szalai,I./1968/: Növényélettan,Tankönyvkiadó, Bpest, 2ol.

Tabernaemontanus /591/: Kreuterbuch.

Trier,G./1931/:Die Alkaloide,Verlag von Gebrüder Borntraeger, Berlin.

Tschirch,A.Oesterle,O./1900/:Anatomische Atlas der Pharmakognosie und Nahrungsmitteekunde,Tauchnitz,Leipzig,35.

Vágujfalvi,D./197o/: Abh.Dtsch.Akad.Wiss.Berlin, Kl.Chem. Geol.Biol. 8, 147.

Vágujfalvi,D.-Lőrincz Gy.-né/1971/: Bot.közlem. 49, 133.

Vickery,H.B.,Pucher,G.W.,Clark,H.E./1936/: Plant.Physiol., 11, 413.

Wehmer,C./195o/: Die Pflanzenstoffe., 2

de Wèvre,A./19o6/: Rec.ℓ'inst.bot.Bruxelles., 2, 233.

Wiegrebe,W.,Faber,L.,Brockmann,H.,Budzikiewicz,H./1969/: Liebigs Akm.Chem., 721, 154.

Wiegrebe,W.,Faber,L.,Breyhan,Th./1969/: Archiv der Pharmazie., 3, 188.

Wiegrebe,W.,Budzikiewicz,H.,Faber,L./1972/: Archiv der Pharmazie., 12, 1oo9.

de Wildeman,E./19o6/: Rec.ℓ'inst.bot.Bruxelles., 2, 337.

Winterstein,E.,Trier,G./1931/: Die Alkaloide. Borntaeger, Berlin, 914.

Zajceva,A.A./1959/: Botan. Zsurn., 44, 1567.

Köszönetemet fejezem ki Dr Ferenczy Lajos egyetemi docensnek a téma adásáért, az elméleti és gyakorlati munkám során felmerült nehézségeket áthidaló, készséges, értékes tanácsaiért.

Köszönettel tartozom Dr Földeák Sándor egyetemi docensnek, Dr Hegyes Péter tud. munkatársnak a vegyületek szintetizálásáért, és azok rendelkezésemre bocsátásáért, továbbá Kővári Árpádné laboránsnak a kisérleti munkában nyujtott segitségéért.